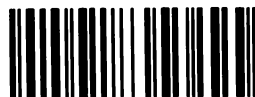


Tomasz Mach

Badania nad hepatotoksycznością disulfiramu
=====

u zwierząt doświadczalnych
=====

Bibl. Medyczna CM UJ



1816097358

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof.dr hab. Stanisław Kirchmayer
Kierownik Kliniki Gastroenterologicznej I.M.W.
Akademii Medycznej im.M.Kopernika w Krakowie

Kraków, 1980 r.

1921

Promotorowi

Panu Prof.dr hab. Stanisławowi Kirchmayerowi

Kierownikowi Kliniki Gastroenterologicznej

I.M.W. AM

oraz

Panu Doc.dr hab. Jerzemu Stachurze

Kierownikowi Pracowni Histochemii i Ultrastruktury

Instytutu Patologii AM

za życzliwą i wszechstronną pomoc w wykonaniu pracy

składam serdeczne podziękowanie

S p i s t r e ś c i
=====

I. Wstęp	str.	1
II. Założenia i cel pracy	"	20
III. Materiał i metodyka	"	22
IV. Wyniki	"	31
V. Omówienie wyników	"	46
VI. Wnioski	"	57
VII. Streszczenie	"	59
Piśmiennictwo	"	64

I. W S T Ę P

=====

Disulfiram jest środkiem farmakologicznym stosowanym od 1948 r. w leczeniu przewlekłego alkoholizmu. Mimo na ogół dobrej tolerancji tego leku, niektóre spostrzeżenia kliniczne przemawiają za niekorzystnym jego oddziaływaniem na wątrobę /20,40,46,76,87,107/.

Uboczne działanie coraz to nowszych leków urasta obecnie do rangi problemu i narzuca potrzebę ostrzejszych kryteriów oceny ich wartości i przydatności klinicznej. Na takie stanowisko wywiera wpływ rozwój farmakogenetyki, farmakokinetyki i farmakodynamiki, który doprowadził do pogłębienia wiedzy na temat zjawisk towarzyszących działaniu leków.

Od czasu pierwszego opisu cholestatycznej żółtaczkii lekozależnej przez Hangerera i Gutmana w 1940 r., zostało poznanych ponad 200 leków, które wywołują uszkodzenie wątroby /4/.

Zasadniczo rozróżnia się leki o bezpośrednim i pośrednim toksycznym działaniu na wątrobę /4,44/. Leiki bezpośrednio hepatotoksyczne charakteryzuje względnie typowy obraz morfologicznych zmian w wątrobie u większości eksponowanych, zależność nasilenia tych zmian od dawki i krótki okres ich rozwoju, a ponadto możliwość odtworzenia uszkodzenia wątroby w eksperymencie na zwierzętach. Natomiast hepatotoksyny pośrednie działają na wątrobę tylko u osób nadwrażliwych na dany lek i wywołują uszkodzenie tego narządu po dłuższym okresie

utajenia. Obraz morfologiczny zmian w wątrobie w tych przypadkach nie jest charakterystyczny i bardzo różnorodny, ponadto brak tu zależności nasilenia uszkodzenia od dawki i najczęściej nie udaje się odtworzyć działania hepatotoksycznego leku w doświadczeniu na zwierzętach /4,44/.

Istotną rolę w rozwoju uszkodzenia wątroby, poza rodzajem leku lub innego czynnika toksycznego, odgrywa jej aktualny stan anatomiczny i czynnościowy /4,44/. Współistnienie jakiegokolwiek schorzenia tego narządu, zwłaszcza upośledzającego funkcję odtruwającą, sprzyja powstawaniu uszkodzeń polekowych. Znaczną rolę przypisuje się również stanowi ogólnemu chorego, a szczególnie odżywieniu, czasokresowi leczenia, wielkości dawki leczniczej oraz współistnieniu chorób innych narządów /44,73/. Mając na uwadze wszystkie wyżej podane czynniki możemy się liczyć z możliwością częstszego rozwoju polekowych uszkodzeń wątroby u przewlekłych alkoholików, wykazujących w wielu przypadkach cechy zaburzonej funkcji oraz struktury wątroby /36,66,102/. Dodać również należy, że alkohol indukując enzymy mikrosomalne w hepatocytach, przyspiesza biotransformację szeregu związków chemicznych i może w ten sposób nasilać uszkodzenie wątroby zależne od hepatotoksycznych metabolitów danego leku /32,37,91/.

Jak widać, w zespole czynników mogących mieć wpływ na wątrobę, trudno jest ustalić bezpośrednią zależność przyczyny i skutku, dlatego konieczne jest przeprowadzenie oceny danego leku pod kątem jego ewentualnej hepatotoksyczności w warunkach eksperymentalnych na zwierzętach.

Disulfiram /dwusiarczek czteroetylotiuramu; Anticol, Antabus, Espéral/ został zsyntetyzowany po raz pierwszy przez Grotzki'ego w 1881 r. /6,14/. Należy do pochodnych kwasu dwutiokarbaminowego /14/, które łącznie z disulfiramem są stosowane w rolnictwie jako środki grzybobójcze /14,22/ oraz w przemyśle gumowym przy wulkanizacji kauczuku /12,14,112/. Począwszy od 1948 r. disulfiram znalazł szerokie zastosowanie w leczeniu alkoholizmu przewlekłego /3,56/.

Disulfiram tworzy białawe kryształki topniejące w temp. 70°C i ulegające rozkładowi w temp. powyżej 100°C /11/. Rozpuszczalność disulfiramu w 100 ml roztworu w temp. 38°C wynosi przeciętnie: 0,2 mg w wodzie, 2 g w alkoholu etylowym, 3 g w oleju, 10 g w glikolu polietylenowym i 30 g w acetonie; ponadto bardzo dobrze rozpuszcza się w chloroformie /11,54/.

Disulfiram po przyjęciu doustnym jest w 70-90% wchłaniany w jelicie cienkim /18/, natomiast wszczepiony podskórnie resorbuje się bardzo wolno, zdaniem Kitsona z szybkością 5% dawki na tydzień /60/.

W świetle jelita szczurów i myszy pod wpływem bakterii /18/, a po wchłonięciu przede wszystkim w wątrobie, ale również we krwi, mięśniach, sercu i nerkach, disulfiram ulega natychmiastowej przemianie do dwuetylodwutiokarbaminianu /DEDC/ /9,18,24,93/. Reakcja wiodąca do powstania DEDC polega na enzymatycznej redukcji wiązania -S-S- disulfiramu przy udziale glutationu i innych związków zawierających wolne grupy sulfhydrylowe -SH /49,52,96/.

W organizmie człowieka, a także królika i świnki morskiej, proces redukcji disulfiramu do DEDC zachodzi powoli,

ponadto zdaniem Eldjarna /9/, DEDC po wnikięciu do komórki może tu zostać ponownie utleniony do disulfiramu przy udziale cytochromu c lub methemoglobiny /121/.

Używając disulfiramu znakowanego siarką radioaktywną Ströme i Eldjarn wykazali, że ok. 10% podanego leku łączy się wiązaniami kowalentnymi z grupami -SH białek, tworząc tzw. mieszane dwusiarczki /"mixed-disulfides"/ /50,95/. Połączenia te dotyczą zarówno białek surowicy krwi, jak i białek komórkowych /49/.

Po wstrzyknięciu dożylnym disulfiramu, stężenie DEDC we krwi osiąga maksymalny poziom po 10 min., natomiast po podaniu doustnym po 6 godz. /9/. Okres półtrwania DEDC we krwi jest dość długi, ze względu na wolną jego biotransformację /18/. Wątrobowy metabolizm DEDC przebiega kilkoma drogami /18,53/:

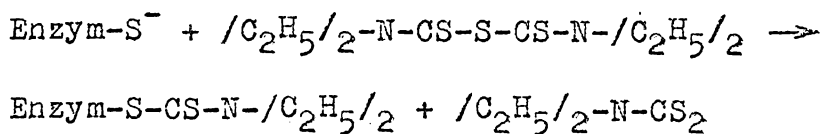
- 1/ poprzez rozpad do dwuetyloaminy i dwusiarczku węgla /CS₂/, który z kolei jest usuwany poprzez płuca /24,95/;
- 2/ poprzez sprzężanie z kwasem glukuronowym, w wyniku czego znaczna ilość DEDC wydalana jest z ustroju przez nerki w postaci kwasu dwuetylodwutiokarbamoilo-1-tio-beta-D-glikozydouronowego /24,53/;
- 3/ poprzez utlenienie do nieorganicznych siarczanów /53/;
- 4/ poprzez enzymatyczną S-transmetylację do estru metylowego kwasu dwuetylodwutiokarbaminowego, który w procesie hydroлізу przechodzi w kwas dwuetylodwutiokarbaminowy i merkaptan metylowy /53/. Wytworzony kwas dwuetylodwutiokarbaminowy może z kolei ulec sprzężaniu z kwasem glukuronowym i w tej postaci opuścić ustrój, a merkaptan metylowy utlenieniu do nieorganicznych siarczanów i formaldehydu /53/.

Disulfiram wydalany jest z ustroju w formie niezmienionej z kałem w ilości ok. 10-20% podanej dawki, po przejściu przez wątrobę drogą nerek w postaci glukuronianu DEDC i siarczanów w ilości ok. 60% dawki, pozostała zaś część usuwana jest poprzez płuca w postaci CS_2 /18,28/. Ok. 20% disulfiramu znajdowano w organizmie ludzkim jeszcze po 6 dniach od podania /28/. Natomiast Iber i wsp. podają, że disulfiram znakowany siarką radioaktywną wydalany jest u ludzi w pierwszych 24 godz. w 60%, w 2-giej dobie w 25%, a reszta w 3-ciej dobie /33/.

Oznaczanie stężenia disulfiramu i jego metabolitów w płynach ustrojowych jest stosunkowo trudne i nie stosowane w praktyce, niemniej jednak ustalono poziom terapeutyczny tego leku we krwi. Wg Malcolma disulfiram stosowany przewlekle drogą doustną osiągał we krwi alkoholików stężenie 2-8 mg/l, natomiast po wszczepieniu podskórnym 1-3 mg/l /70/. Stężenie zaś końcowego metabolitu disulfiramu, CS_2 , mierzone w powietrzu wydechowym wynosi zdaniem tego autora 0,1-0,4 mg/m³ /70/. Sauter i wsp. /6,95/ badając zachowanie się we krwi produktów biotransformacji disulfiramu stwierdzili, że przy doustnym podaniu tego leku, poziom CS_2 we krwi wynosi zależnie od dawki 0-0,6 ug/ml, DEDC 0,2-1,0 ug/ml, zaś po wszczepieniu podskórnym, skąd wchłanianie leku jest indywidualnie różne, stężenia jego metabolitów wykazują bardzo duże wahania i są praktycznie nieoznaczalne po 3 miesiącach.

Disulfiram jest inhibitorem licznych enzymów. Uważa się, że działanie to jest następstwem tworzenia mostków pomiędzy dwoma atomami siarki wchodzącymi w skład tego leku, a grupą sulfhydrylową -SH aktywnych miejsc białka enzymatycznego,

co wyraża wg Neims'a następujące równanie /50/:



Zgodnie z powyższym, strukturalnie podobne enzymy zawierające grupy -SH w swoich centrach aktywnych, mogą być blokowane przez disulfiram /50/. Do takich enzymów należy dehydrogenaza aldehydu octowego /49/ i monoaminooksydaza /99/, ponadto disulfiram hamuje aktywność oksydazy ksantynowej /54/, heksokinazy /49/, dehydrogenazy bursztynianowej /96/, licznych esteraz /121/, systemów oksygenaz związanych z mikrosomami /122,123/ oraz innych enzymów /49,121/.

Duże zainteresowanie, szczególnie w ostatnich latach, budzi wpływ disulfiramu na dehydrogenazę aldehydu octowego, enzymu zależnego od nukleotydu NAD^+ , a biorącego udział w metabolizmie alkoholu etylowego, utleniając aldehyd octowy do kwasu octowego /45,72,113/. Disulfiram jak wiadomo blokuje aktywność tej dehydrogenazy, co stanowi o wykorzystaniu disulfiramu w leczeniu przewlekłych alkoholików /14,45/.

Wątroba zawiera dwa izoenzymy dehydrogenazy aldehydu octowego, różniące się zarówno lokalizacją wewnątrzkomórkową, jak i wartością stałej Michaelisa K_m /104/. W wątrobie szczura dehydrogenaza aldehydu octowego zlokalizowana w mitochondriach, posiadająca niską stałą K_m /mniejsza niż 10 $\mu M/ml$ /, bierze główny udział w utlenianiu aldehydu octowego, jakkolwiek stanowi tylko 1/3 całkowitej aktywności tego enzymu w wątrobie /104/. Ponadto przede wszystkim ten enzym mitochondrialny jest blokowany przez disulfiram /77/. Wysokie dawki disulfiramu

rzędu 150-600 mg/kg podawane szczurom i innym zwierzętom laboratoryjnym wg Tottmara zmniejszają aktywność wspomnianego enzymu 2-3-krotnie i zwalniają w związku z tym szybkość eliminacji alkoholu etylowego z krwi o 36% /104/. Deitrich i Erwin w 1971 r. wykazali, że hamowanie dehydrogenazy aldehydu octowego przez disulfiram jest procesem nieodwracalnym i stąd zwiększenie aktywności enzymu wymaga syntezy nowych jego częścieczek /50/.

W cytoplazmie hepatocytów szczura występuje ponadto drugi izoenzym dehydrogenazy aldehydu octowego, charakteryzujący się wysoką stałą K_m /rzędu 0,9-1,7 mM/l/, którego rola w metabolizmie aldehydu octowego jest znacznie mniejsza i który zdaniem Tottmara nie jest blokowany przez disulfiram /104/.

Niezależnie od hamowania czynności enzymów za pośrednictwem wiązania ich grup -SH w miejscach aktywnych, disulfiram może blokować czynność wielu enzymów także na innej drodze i za pośrednictwem swoich metabolitów /53/; Jak wiadomo disulfiram będąc związkiem silnie chelatującym metale, hamuje czynność beta-hydroksylazy dopaminy /17,96/, która jest metaloenzymem miedziowym występującym w strukturach subkomórkowych neuronów adrenergicznych /53/. Poza disulfiramem także DEDC, inne pochodne kwasu dwuetylodwutiokarbaminowego oraz CS_2 hamują aktywność tego enzymu i w konsekwencji dochodzi do obniżenia ilości noradrenaliny oraz wzrostu dopaminy w zakończeniach nerwowych /84/, co prowadzi do zaburzenia ich funkcji i objawia się w postaci sedacji, depresji ruchliwości spontanicznej, katalepsji, obniżenia progu drgawkowego, hypotermii

i in. /53,84/. Dodać należy również, że wyżej wymienione inhibitory beta-hydroksylazy dopaminy mają także wpływ na układ krążenia wywołując między innymi obniżenie ciśnienia tętniczego krwi /94,125/, objaw często obserwowany w trakcie tzw. reakcji disulfiramowo-alkoholowej u leczonych alkoholików /51, 94,105/.

W dostępnym piśmiennictwie znalazłem jedynie nieliczne dane dotyczące wpływu disulfiramu na przewód pokarmowy. Zagadnieniem tym zajmowali się autorzy francuscy, De Saint Blanquat i wsp. oraz Lamboeuf i wsp., którzy wykazali, że disulfiram zwiększa sekrecję kwasu solnego, wywołuje przekrwienie śluzówki żołądka oraz hamuje motorykę żołądka i jelit /18,57/.

W trakcie leczenia disulfiramem obserwuje się szereg objawów ubocznych. Zaobserwowano, że bardzo zbliżone objawy pojawiają się u narażonych przewlekłe na metabolity disulfiramu, a szczególnie CS₂ /19,22,39,68,85,86/. Rozpatrując przyczyny rozwoju objawów ubocznych wywołanych przez disulfiram, Rainey wysunął przypuszczenie, że toksyczność tego leku może być konsekwencją biochemicznych efektów tak samego leku, jak również jego metabolitów, tzn. DEDC, dwuetyloaminy i CS₂ /85, 86/. Szczególnie dużo podobieństw stwierdzono w zakresie działania disulfiramu i CS₂, dlatego też Kane w 1970 r. wysunął hipotezę, że CS₂ jest odpowiedzialny za powikłania spotykane po disulfirامية /39/. Hipotezę tą poparło kilku innych badaczy, m.in. Rainey, który stwierdził, że z 125 mg disulfiramu powstaje w organizmie 30 mg CS₂, a oba te związki podane osobno w powyższych dawkach wywołują podobne objawy, szczególnie w odniesieniu do układu krążenia /86/.

Disulfiram oraz CS_2 hamują aktywność enzymów mikrosomalnych utleniających leki /15,26,122/. Jedną z ważniejszych reakcji w biotransformacji leków i innych związków chemicznych jest związanie z cytochromem P-450 w mikrosomach wątrobowych /71,114/. Disulfiram i CS_2 zarówno obniżają stężenie tego cytochromu, jak i przyłączają się do niego i w ten sposób hamują kompetetywnie biotransformację innych leków, nasilając ich efekty farmakologiczne oraz toksykologiczne /16,26,122/.

Przykładowo podam, że w 1966 r. Olsen stwierdził, iż disulfiram hamuje w wątrobie metabolizm phenytoiny /79/. Podobne spostrzeżenia poczynił Vesell w odniesieniu do antypiryny /108/. Zemaitis i Greene oraz inni badacze donoszą o pewnych lekach, których metabolizm ulega zwolnieniu w trakcie stosowania disulfiramu, doprowadzając w efekcie do powikłań toksycznych /16,81,122,123/. Podobne do disulfiramu hamowanie przez CS_2 metabolizmu leków opisali po raz pierwszy Łazariew i wsp. w 1965 r. /26/.

Z drugiej zaś strony blokowanie enzymów mikrosomalnych przez disulfiram i CS_2 zapobiega rozpadowi stosunkowo mało szkodliwych substancji egzogennych do ich toksycznych metabolitów /5,23/. Wielu autorów wykazało, że disulfiram może tą drogą zapobiegać rozwojowi raka jelita grubego u szczurów, wywołanego przez karcinogenne produkty biotransformacji związków nitrozaminowych i innych /5,23,97,111/.

Omawiając mechanizm działania disulfiramu i jego pochodnej CS_2 należy wreszcie zaznaczyć, że w przebiegu wątrobowych przemian CS_2 powstaje siarczek tionylu /COS/ i aktywna siarka, która wiąże się wiązaniem atomowym z białkami enzymatycznymi frakcji mikrosomalnej i obniża ich aktywność, prawdopodobnie

poprzez zmianę ich budowy trzeciorzędowej i tym samym zapoczątkować może zmiany toksyczne w wątrobie /15,16/.

Powyżej przytoczone dane mogą przemawiać za tym, że CS_2 odgrywa pewną rolę w działaniu disulfiramu oraz w wywoływaniu podisulfiramowych objawów ubocznych u leczonych alkoholiczków. Zapewne dalsze badania nad tym lekiem wyjaśnią bliżej ten interesujący problem.

Leczenie przewlekłego alkoholizmu staje się coraz poważniejszym problemem lekarskim i społecznym w związku z niepokojącym zjawiskiem wzrastającego spożycia alkoholu w całym świecie, w tym również w naszym kraju /45,59,75/.

Disulfiram wprowadzili do leczenia przewlekłego alkoholizmu Duńczycy Hald, Jacobsen i Martensen-Larsen w 1948 r. /3,56/, natomiast w Polsce Zajączkowski w 1949 r. /119/.

W pierwszych dniach terapii disulfiramowej, która trwa od kilku do kilkunastu miesięcy, przeprowadza się zwykle próbę wrażliwości na alkohol. Po kilku dniach stosowania właściwie dobranych dla każdego chorego dawek disulfiramu doustnego podaje się choremu kilkanaście mililitrów alkoholu etylowego do wypicia, co powoduje wystąpienie tzw. reakcji disulfiramowo-alkoholowej, z uczuciem gorąca, dusznością, lękami, potami, znacznym przekrwieniem górnej połowy ciała, szczególnie twarzy, tachykardią i tachypnoe oraz całym szeregiem innych objawów, szczegółowo opisanych w licznych pracach /3,12,48,51,77,105/.

Przeżycie takiej reakcji zniechęca leczonych do przyjmowania alkoholu, a wytworzona w ten sposób przymusowa abstynencja pozwala na przeprowadzenie w tym czasie innych metod leczenia, przede wszystkim psychoterapii i socjoterapii /27,

100/. Wspomnieć również należy, że niektórzy autorzy stosują terapię disulfiramem bez uprzedniego wywoływania reakcji disulfiramowo-alkoholowej /48/.

Podobne, a niekiedy i lepsze /35,43/ efekty terapeutyczne od uzyskiwanych disulfiramem doustnym, osiąga się wszczepiając lek podskórnie /35,43,69,115/. Metodę tą wprowadził Marie we Francji w 1955 r. /6/. Przyjęła się ona w wielu krajach, szczególnie europejskich, w tym również w Polsce /35,56, 77,109/.

Ostatnio jednak pojawiły się liczne prace kwestionujące działanie farmakologiczne implantowanego disulfiramu /6,69, 116/, a niektórzy wręcz uważają, że czynnikiem podtrzymującym abstynencję jest wyrażona uprzednio na piśmie gotowość do jej przestrzegania oraz świadomość posiadania wszczepionego leku /100/. Ustalenie faktu, jak znaczny jest udział tzw. "bariery chemicznej" i czynników psychicznych w leczeniu odwykowym disulfiramem, wymaga dalszych badań.

Disulfiram nie jest pierwszym środkiem stosowanym dla uczulenia organizmu na alkohol /3/. W 1914 r. Koelsch zwrócił uwagę, że cyjanamid wapnia wywiera wpływ na metabolizm alkoholu i użyty z alkoholem wywołuje rozwój charakterystycznych przykrych reakcji /72,93/. Ferguson w 1956 r. wprowadził cyjanamid wapnia /Temposil/ do leczenia alkoholizmu, środek ten okazał się jednak dość toksyczny /72/. W 1975 r. Lindberg wyosobnił z grzyba *Coprinus atramentarius* 1-aminocyklopropanol, który hamuje aktywność dehydrogenazy aldehydu octowego i podany łącznie z alkoholem wywołuje u ludzi podobne efekty do podobnych disulfiramowych /72/. Ponadto Moench w 1950 r. zauważył, że

węgiel zwierzęcy uzyskany ze spalonych kości podany łącznie z alkoholem wywołuje u alkoholików objawy zbliżone do reakcji disulfiramowo-alkoholowej /72/.

Przyczyna i patomechanizm rozwoju reakcji disulfiramowo-alkoholowej nie zostały dotąd w pełni poznane i są w ostatnich latach przedmiotem licznych badań /9, 17, 51, 94, 105, 125/. Zaznaczyć należy, że w przeciwieństwie do hipotez Halda i Jacobsena, brany jest pod uwagę jako czynnik odpowiedzialny za rozwój tej reakcji nie tylko wytworzony w nadmiarze aldehyd octowy, gdyż - jak stwierdzono - wstrzyknięcie dożylnie aldehydu wywołuje wiele odmiennych objawów /94, 105, 125/, lecz również dyskutuje się hamowanie przez disulfiram biosyntezy amin biogennych, działanie metabolitów tego leku a także, jak podaje Sauter i wsp. /94/ oraz inni /48, 51, 105/ wpływ osobniczo zmiennych aktywności beta-hydroksylazy dopaminowej oraz bliżej nieznanymi indywidualnymi predyspozycji do rozwoju tej reakcji disulfiramowo-alkoholowej.

Ze względu na uboczne efekty leczenie disulfiramem nie może być przeprowadzone u wszystkich alkoholików. W naszym piśmiennictwie liczni autorzy /Kulisiewicz, Lewkowski, Zajączkowski i inni/ /56, 62, 63, 77, 119/ podają klasyczne już listy przeciwwskazań ze strony układu krążenia /zapalenie mięśnia serca, nadciśnienie tętnicze, miażdżyca naczyń, niewydolność wieńcowa/, układu oddechowego /czynna gruźlica płuc, dychawica oskrzelowa/, przewodu pokarmowego /marskość wątroby/, układu krwiotwórczego, moczowego /stany zapalne nerek/, dokrewnego /nadczynność tarczycy, cukrzyca/, centralnego systemu nerwowego /padaczka, stany po urazie CSN/. Ponadto

przeciwwskazaniem są narkomanie, psychozy oraz ciąża /62,63/.

Objawy uboczne terapii disulfiramowej można podzielić na dwie grupy: 1/ powikłania reakcji disulfiramowo-alkoholowej oraz 2/ powikłania po disulfiramie per se /31,61,62,65/. Piśmiennictwo polskie dotyczące tych problemów jest bardzo obszerne /12,30,31,64,65,77,80/.

Wśród licznych powikłań reakcji disulfiramowo-alkoholowej do najpoważniejszych, choć rzadkich i występujących jedynie po wypiciu dużej ilości alkoholu, należy zapaść naczyniowa / 8/10000 przypadków / /30/. Zgony w przebiegu reakcji disulfiramowo-alkoholowej mogą też być spowodowane wg Kulisiewicza /56/ ostrą niewydolnością mięśnia sercowego, porażeniem ośrodka oddechowego, wynaczynieniem śródmózgowym, zatorami naczyń mózgowych, obrzękiem mózgu, zakrzepami naczyń mózgowych lub innymi przyczynami, których nie wyjaśniono nawet sekcyjnie /12,30,56/.

Natomiast po samym disulfiramie mogą wystąpić liczne powikłania ze strony przewodu pokarmowego, takie jak /cyt. za Operaczem, 80/: niesmak w ustach, uczucie zgagi, gniotące bóle brzucha, odbijania, nudności, brak łaknienia, wymioty, biegunki lub zaparcia, wzdęcia, ponadto objawy ze strony układu krążenia, układu nerwowego, krwiotwórczego, szereg objawów psychotycznych oraz alergiczne reakcje skórne /12, 31,80,107,112/.

Cały szereg objawów ubocznych występujących po disulfiramie pojawia się wg niektórych autorów u 16-64% leczonych, przede wszystkim w pierwszych 2-4 tyg. terapii i najczęściej ustępują one samoistnie po ok. 2 tyg. /31,80/. Lewkowski

podaje /61,65/, że objawy uboczne po disulfiramie powstają w różnym okresie stosowania leku i różny jest ich obraz, a ponadto występują one najwybitniej u alkoholików o negatywnym nastawieniu do leczenia. Lewkowski na materiale 5000 leczonych alkoholików, obserwował podisulfiramowe objawy uboczne u 68,8% przypadków, a częstość ich malała z biegiem czasu tak, że po roku stosowania disulfiramu objawy te podawało już tylko 22,1% chorych /63/. Natomiast według bogatego doświadczenia łódzkich przychodni przeciwalkoholowych, toksyczność disulfiramu w stosowanych przeciętnie dawkach jest stosunkowo niska /80/.

Wiele spośród objawów ubocznych po disulfiramie jest zbliżonych do powikłań spotykanych po ekspozycji na CS₂, stąd też zdaniem wielu autorów, m.in. Kane'a i Rainey'a, CS₂ będący końcowym metabolitem disulfiramu, jest głównie odpowiedzialny za większość farmakologicznych i toksykologicznych efektów obserwowanych po tym leku /39,85,86/.

W obszernym piśmiennictwie dotyczącym disulfiramu, jedynie pojedyncze spostrzeżenia dotyczą ubocznego wpływu tego leku na wątrobę u zwierząt laboratoryjnych.

Child i Crump w 1952 r. podali, że disulfiram stosowany w doświadczeniu ostrym na szczurach, psach i królikach w dawkach rzędu kilkuset mg/kg, wywoływał w wątrobie liczne ogniska martwicy /11/.

Lewkowski w 1965 r. badając histologicznie wątrobę świnek morskich otrzymujących przewlekłe disulfiram w dawkach 5-krotnie wyższych od dawek ludzkich, zaobserwował rozrost układu siateczkowo-śródbłonkowego w tym narządzie, które jego

zdaniem "należało raczej uważać za stan odczynowy ustroju w granicach fizjologicznych" /61,62/.

W 1966 r. Gersbein stwierdził, że podawanie szczurom diety zawierającej 0,2-0,3% disulfiramu, wywoływało w wątrobie miernego stopnia zwłóknienie przestrzeni wrotnych z proliferacją przewodników żółciowych i z naciekami zapalnymi /28/. Natomiast Ekvärn i wsp. w 1977 r. zauważyli, że dożołądkowe podanie szczurom disulfiramu w dawce 150 mg/kg przez tydzień, powodowało rozwój nieznaczego stopnia stłuszczenia hepatocytów, które nasilało się przy dłuższej 2-tygodniowej ekspozycji na lek /22/.

Do 1974 r. nie było w literaturze żadnych udokumentowanych danych odnośnie ubocznego wpływu disulfiramu na wątrobę u ludzi. Keeffe i Smith podają, że w około 160 pracach, które ukazały się w latach 1948-1971 na temat terapii disulfiramowej, nie znaleziono żadnych informacji na temat hepatotoksyczności tego leku u ludzi /40/.

Pierwsze doniesienie w piśmiennictwie polskim dotyczące wpływu disulfiramu na wątrobę alkoholików opublikował w 1965 r. Lewkowski /61/. Autor ten badał 25 alkoholików pijących przez 5-10 lat i przyjmujących disulfiram /Anticol/ przez 1 rok. Lewkowski pisze, że "jeśli chodzi o wątrobę, to mimo skarg, a u niektórych i zmian przedmiotowych /powiększenie wątroby/, rutynowe badania nie wykazały zmian, dopiero próba hipurowa i alkoholowa wykazały u części zmiany, wskazujące na uszkodzenie wątroby. Stąd wniosek, że mimo nałożenia się dwóch czynników /uprzednie długotrwałe nadużywanie alkoholu, a następnie używanie antikolu/ u wybranych pacjentów zgłaszających

skargi, stwierdzono nieznaczny stopień zmian ze strony wątroby" /61/. W dwa lata później Lewkowski i Jagiełło zbadali wpływ miesięcznego stosowania antikolu w dawce 0,5 g/dobę na stan wątroby 20 alkoholików i w podsumowaniu pisali, że "... uzyskane wyniki prób wątrobowych /kadmowej, tymolowej i lugolowej/, badania zmian aktywności aminotransferaz i fosfataz surowicy oraz elektroforezy białek nie dostarczyły podstaw do jakiegokolwiek wniosku" /64/. Niemniej jednak Lewkowski i Jagiełło postulowali już wówczas, aby przewlekłym alkoholikom leczonym disulfiramem stosować dla oceny stanu wątroby nie tylko próby biochemiczne, lecz także badania bioptyczne tego narządu /64/.

W ostatnich latach pojawiło się kilka klinicznych prac kazuistycznych dotyczących hepatotoksyczności disulfiramu /20, 40, 76, 87, 107/. W pracach tych dyskutowany jest przede wszystkim udział anafilaksji, jako przyczyny występowania powikłań wątrobowych u leczonych tym preparatem /40/.

Pierwszy opis przypadku zapalenia wątroby wywołanego przez disulfiram opublikowali w 1974 r. Keefe i Smith /40/. Autorzy ci sugerują, że disulfiram może wywoływać zapalenie wątroby bardzo rzadko i tylko u niektórych chorych, przy czym dla wykrycia tego powikłania powinno się oznaczać zachowanie się aminotransferaz przed i po wprowadzeniu leku /40/. Poza rzadkością tego powikłania jego rozpoznanie utrudnia duża częstość poalkoholowych uszkodzeń wątroby w populacji leczonej disulfiramem.

W rok później ukazał się artykuł Eisen'a i Ginsberg'a /20/, w którym opisano przypadek ciężkiego uszkodzenia wątroby

po 2 ekspozycjach na disulfiram. Następnie w 1977 r. Ranek i Andreasen opublikowali obserwacje hepatotoksycznego wpływu disulfiramu u 6 przewlekłych alkoholików, z których 5 zmarło z powodu ciężkiego uszkodzenia wątroby ze śpiączką /87/. Badanie histologiczne wątroby zmarłych wykazało zwłóknienie tego narządu, cholestazę, nacieki zapalne w przestrzeniach wrotnych oraz martwicę hepatocytów. Zaznaczyć trzeba, że nie spotkano tu cech typowych dla reakcji alergicznych, jak zmiany skórne, eozynofilia, przeciwciała np. przeciwmitochondrialne i in. Autorzy podkreślają, że rozwój objawów uszkodzenia wątroby disulfiramiem pojawia się późno, po ok. 25 tyg. od podania leku, a więc można łatwo przeoczyć związek tego powikłania ze stosowaniem leku. Ranek i Andreasen sugerują ponadto celowość podjęcia przewlekłych badań nad hepatotoksycznością disulfiramu u zwierząt /87/.

Ostatnio w 1978 r. Morris i wsp. opublikowali kolejny opis przypadku zapalenia wątroby wywołanego przez disulfiram /76/.

Trzeba podkreślić, że wszyscy wyżej wymienieni autorzy zgodnie uważają, że wykrycie u przewlekłych alkoholików zapalenia wątroby wywołanego przez disulfiram jest bardzo trudne ze względu na częstą obecność u leczonych alkoholowych uszkodzeń wątroby. Jednak we wszystkich opisanych przypadkach czynnikiem etiologicznym wywołującym hepatitis był z pewnością disulfiram, gdyż lek ten wywoływał zmiany w wątrobie alkoholików, którzy: 1/ mieli prawidłowe testy biochemiczne przed wprowadzeniem terapii, 2/ nie otrzymywali innych leków oraz nie pili alkoholu podczas leczenia, 3/ biopsja wątroby

nie wykazała cech alkoholowego uszkodzenia wątroby, 4/ $\text{HB}_{\text{S}}\text{Ag}$ był nieobecny, ponadto wywiad co do przebytego zapalenia wątroby był ujemny, 5/ ponowna ekspozycja na disulfiram wywoływała po raz kolejny te same zaburzenia ze strony wątroby, 6/ zaburzenia te ustępowały po odstawieniu leku /76/.

W naszym piśmiennictwie pierwszy Kirchmayer i wsp. w 1977 r. zwrócił uwagę na hepatotoksyczność disulfiramami /46/. Kirchmayer i wsp. wykazali, że u 48% nałogowych alkoholików, u których w przebiegu hospitalizacji w zakładzie zamkniętym wykonywano próby wrażliwości na disulfiram, doszło do obostżenia już istniejących lub wystąpienia dyskretnych zmian zapalnych w wątrobie, czemu towarzyszył statystycznie znamienny wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej w surowicy, a niekiedy również wzrost fosfatazy alkalicznej i bilirubiny. Ze względu na pojawianie się wspomnianych powyżej doniesień kazuistycznych o hepatotoksyczności disulfiramami u ludzi oraz z uwagi na poczynione przez Kirchmayera i wsp. obserwacje sugerujące toksyczny wpływ tego leku na wątrobę u alkoholików, zostały przeprowadzone przez Kirchmayera i Cichockiego oraz wsp. /47/ badania eksperymentalne, celem sprawdzenia wpływu disulfiramami na wątrobę w doświadczeniu ostrym na szczurach. Badania te wykazały, że disulfiram stosowany w stosunkowo wysokich dawkach /ok. $\text{C}, 1 \text{LD}_{50}$ / wywoływał wzrost surowiczej aktywności fosfatazy alkalicznej, zaburzenie struktury i funkcji lizosomów w komórkach wątrobowych, pojawianie się ognisk degeneracji cytoplazmy oraz występowanie figur mielinowych z przemieszczeniem grzebieni w mitochondriach hepatocytów. Uzyskane wyniki przemawiają więc za

toksycznym wpływem na wątrobę disulfiramu stosowanego u szczu-
rów w dużych dawkach przez krótki okres czasu.

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Pojedyncze doniesienia kazuistyczne dotyczące podisulfiramowego uszkodzenia wątroby nałogowych alkoholików /20,40, 76,87,107/, jak również badania kliniczne Kirchmayera i wsp. /46/ oraz badania eksperymentalne Kirchmayera, Cichockiego i wsp. /47/ wykazujące hepatotoksyczny efekt dużych dawek disulfiramu podawanego w doświadczeniu o s t r y m u szczurów, skłoniły mnie do podjęcia badań mających na celu wyjaśnienie wpływu na wątrobę p r z e w l e k ł e g o stosowania disulfiramu u zwierząt laboratoryjnych.

Przewlekłe dawkowanie stanowi o tyle lepszy model dla określenia hepatotoksyczności disulfiramu, ponieważ odpowiada sposobowi podawania tego leku w klinice nałogowego alkoholizmu.

Lek ten stosowany jest u przewlekłych alkoholików w większości przypadków wykazujących zaburzoną przemianę tłuszczową. Dlatego też zamierzałem również zbadać jaki wpływ na gospodarkę lipidową wywiera przewlekłe stosowany disulfiram u zwierząt.

Disulfiram ma wywierać działanie hepatotoksyczne przede wszystkim u osób z uprzednio już uszkodzoną wątrobą /Kirchmayer i wsp., 47/, dlatego też badania niniejsze rozszerzyłem o kontrolę wpływu tego leku na doświadczalnie uszkodzoną wątrobę zwierząt laboratoryjnych.

Tak więc niniejsza praca ma na celu wyjaśnienie:

- 1/ czy disulfiram podawany przewlekłe wykazuje biochemicznie lub morfologicznie uchwytne uszkodzenie wątroby;
- 2/ która z dwóch stosowanych w leczeniu postaci disulfiramu podawanego przewlekłe wywołuje bardziej nasilone zmiany:
 - a/ Anticol /Polfa/ - podawany dożołądkowo, czy też
 - b/ Espéral /Solac/ - wszczepiany podskórnice;
- 3/ czy disulfiram podawany przewlekłe wywołuje zmiany składu lipidów oraz czy i w jakim stopniu te zmiany pozostają w związku z uszkodzeniem wątroby;
- 4/ czy disulfiram wywiera bardziej uchwytne działanie hepatotoksyczne na wątrobę już uprzednio uszkodzoną, oraz
- 5/ porównanie efektów działania disulfiramu podawanego przewlekłe z efektem działania disulfiramu stosowanego w tych samych dawkach łącznie z alkoholem etylowym.

Wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych nie mogą być - rzecz prosta - odnoszone bezkrytycznie do patologii ludzkiej, jakkolwiek ogólna organizacja systemu metabolizującego leki jest podobna u prawie wszystkich gatunków ssaków /38/. Niemniej badania te powinny naświetlić mechanizm patogenyzy hepatotoksycznego działania disulfiramu u ludzi, a uzyskane informacje mogą być przydatne dla modyfikacji wskazań do leczenia przewlekłego alkoholizmu.

III. MATERIAŁ I METODYKA

=====

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samcach rasy Wistar, o wadze 220-260 g. Zwierzęta przebywały w jednokowych warunkach środowiskowych, w pomieszczeniach jasnych, przewietrzanych, o temperaturze utrzymywanej w zakresie 20-22°C i wilgotności względnej 65-70%.

Zwierzęta karmione były standartową dietą laboratoryjną oraz piły wodę ad libitum. Każdy szczur otrzymywał ok. 15 g/ /dzień paszy granulowanej "Murigran" oraz ok. 6 g/dzień ziarna pszenicy. Dieta zawierała zgodnie z przyjętymi normami /7/ ok. 21% białka, 5% tłuszczu, pozostałe pokrycie kaloryczne w postaci węglowodanów, a ponadto odpowiednie ilości witamin i pierwiastków śladowych. Karmienie przerywano na 24 godzin przed zabiciem zwierząt, utrzymując jedynie wolny dostęp do wody.

Szczury ważono w pierwszym i ostatnim dniu doświadczenia oraz notowano ich wygląd zewnętrzny i zachowanie. Zwierzęta zabijano przez wykrwawienie drogą punkcji serca i po pobraniu krwi oraz tkanki wątrobowej od dalszych badań, wykonywano autopsję.

Doświadczenie zmierzające do określenia hepatotoksyczności przewlekłe podawanego disulfiramu oraz disulfiramu łącznie z alkoholem trwało 6 tygodni. Z piśmiennictwa bowiem wiadomo, że w przebiegu leczenia odwykowego disulfirame

większość objawów ubocznych pojawia się w pierwszych 6 tygodniach kuracji /64/, a ponadto obserwacje kliniczne Kirchmayera i wsp. /46/ sugerujące hepatotoksyczność disulfiram u przewlekłych alkoholików dotyczyły okresu 4-8 tygodni /średnio 6 tygodni/. Również w przebiegu leczenia disulfiramem implantowanym podskórnie stwierdzono najwyższe stężenia disulfiram i jego metabolitów w surowicy krwi alkoholików w pierwszych 4-8 tygodniach.

Disulfiram stosowano w dawce 150 mg/kg, czyli w ilości 2% LD₅₀ dla szczura /11/. Zbliżone dawkowanie podawało wielu innych autorów w badaniach eksperymentalnych, a jak wykazał Tottmann /104/ disulfiram stosowany u szczurów w tej dawce skutecznie hamuje aktywność dehydrogenazy aldehydu octowego. Dawka 150 mg/kg, czyli około 40 mg na szczura, stanowi ok. 1/10 przeciętnej dziennej dawki stosowanej u ludzi w terapii odwykowej. Wszczepiony podskórnie disulfiram w ilości 400 mg/kg, czyli około 100 mg na szczura, stanowił ok. 1/10 dawki implantowanej podskórnie u alkoholików /6,115/.

Ze względu na złą rozpuszczalność disulfiram w wodzie i wynikające stąd trudności w dokładnym dawkowaniu wodnej zawiesiny tego leku, wzorując się na innych autorach /72,104/, zawieszano sproszkowany i odważony disulfiram w 5% roztworze gumy arabskiej. Tak przygotowaną zawiesinę disulfiram jak również disulfiram w 10% alkoholu, podawano w odpowiedniej dawce i objętości 2-2,5 ml, dożołądkowo metalową sondą zwierzętom na czczo i o jednakowej porze dnia.

Zwierzęta podzielono na 7 grup liczących po 20 szczurów: Grupa I - otrzymała dożołądkowo zawiesinę disulfiram /Anticol,

Polfa, Warszawa/ w dawce 150 mg/kg wagi ciała/dobę, codziennie przez 6 tygodni;

Grupa II - otrzymała dożołądkowo zawiesinę disulfiram w dawce 300 mg/kg wagi ciała/dobę, codziennie przez 6 tygodni;

Grupa III - otrzymała dożołądkowo 10% roztwór etanolu w dawce 1,0 g/kg wagi ciała/dobę /tj. ok. 2,5 ml na szczura/, codziennie przez 6 tygodni;

Grupa IV - szczurom tej grupy podawano disulfiram z etanolem łącznie sondą dożołądkowo codziennie przez 6 tygodni w dawkach dobowych jak w grupach I i III, w postaci ok. 2,5 ml roztworu na zwierzę;

Grupa V - 20 szczurom w krótkotrwałej narkozie eterowej wszczepiono podskórnie w okolicy międzyżopatkowej disulfiram /Espéral, Solac, Francja/ w dawce 400 mg/kg wagi ciała. Trzy zwierzęta, u których rana zropiała wyeliminowano z badań;

Grupa VI - 20 szczurom wszczepiono disulfiram w dawce i w sposób jak w grupie V, a ponadto podawano roztwór etanolu jak zwierzętom grupy III przez 6 tygodni codziennie dożołądkowo;

Grupa VII - kontrolna. 20 szczurom podawano sondą dożołądkowo 2 ml roztworu soli fizjologicznej codziennie przez 6 tygodni. Ponadto 20 szczurów poddano zabiegowi operacyjnemu jak w grupie V i VI, lecz bez wszczepienia disulfiram.

Po upływie 6 tygodni zwierzęta zabijano przez punkcję serca i pobierano krew oraz tkankę wątrobową do dalszych badań.

Doświadczenie zmierzające do określenia wpływu disulfiram na wątrobę uszkodzoną przeprowadzono na szczurach, którym uszkadzano ten narząd chlorowodorkiem D-galaktozaminy

/Hepasamin, K.Roth, RFN/. Związek ten wywołuje zapalenie wątroby morfologicznie zbliżone do zapalenia wątroby występującego u ludzi /41,74,89/.

Zwierzęta podzielono na 4 grupy liczące po 20 szczurów: Grupa I - otrzymywała sondą dożołądkowo przez 3 kolejne dni zawiesinę disulfiramu /Anticol, Polfa, Warszawa/ w dawce dobowej 600 mg/kg wagi ciała. Dawka ta była zbliżona do 0,1 LD₅₀ i podobna do stosowanej w poprzednio publikowanej pracy /47/;

Grupa II - 20 szczurom podawano dootrzewnowo przez 2 kolejne dni D-galaktozaminę w dawce 375 mg/kg wagi ciała/dobę w 2 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej;

Grupa III - otrzymała D-galaktozaminę w dawce i w sposób jak w grupie II. Ponadto po upływie 24 godzin od ostatniej iniekcji D-galaktozaminy podawano zwierzętom dożołądkowo zawiesinę disulfiramu w dawce 600 mg/kg wagi ciała/dobę przez 3 kolejne dni jak w grupie I;

Grupa IV - kontrolna. Zwierzęta otrzymywały po 2 iniekcje dootrzewnowe 2 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej oraz przez następne 3 dni sondą dożołądkowo po 2 ml tego roztworu.

Szczury zabijano przez wykrwawienie drogą nakłucia serca w grupie I, III i IV po 4 godzinach od ostatniej dawki dożołądkowej oraz w grupie II po upływie 78 godzin od podania drugiej iniekcji D-galaktozaminy.

Krew do badań biochemicznych pobierano przez punkcję serca, a po skrwawieniu, otwierano szczurom jamę brzuszną i pobierano wycinki ze środkowego płata wątroby do badań biochemicznych i morfologicznych.

Skrawki wątroby przemywano w lodowatej soli fizjologicznej celem usunięcia ewentualnych resztek krwi, wysuszano na bibule, ważono i zamrażano. Zamrożone skrawki wątroby homogenizowano w szklanym homogenizatorze typu Potter-Elvehjema w 3 ml lodowatej soli fizjologicznej przy oznaczeniach enzymatycznych oraz w odpowiednich roztworach przy badaniu lipidów, a następnie wirowano przez 20 minut przy obrotach 3000/min. i odciągano nadsącz.

W surowicy krwi i w nadsączu oznaczano aktywności aminotransferazy alaninowej /ALAT/ i asparaginianowej /AspAT/, fosfatazy alkalicznej /AP/ i cholinesterazy /ChE/. W surowicy krwi badano stężenie bilirubiny całkowitej. Ponadto w surowicy krwi oraz w homogenatach tkanki wątrobowej oznaczano stężenie wolnych kwasów tłuszczowych /FFA/, trójglicerydów /TG/ i cholesterolu /CH/.

Aktywność ALAT i AspAT oraz AP oznaczano spektrofotometrycznie zoptymalizowanymi metodami kinetycznymi /2/, posługując się testami firmy Boehringer, Mannheim, RFN. Natomiast aktywność ChE badano metodą kinetyczną posługując się testem firmy Boehringer, Mannheim, RFN, opartym na metodzie acetylocholinowej Ellmana i wsp. /21,98/. Aktywność enzymów wyrażano w mU na 1 ml surowicy oraz w mU na 1 mg wilgotnej tkanki wątrobowej.

Bilirubinę całkowitą oznaczano w surowicy krwi metodą Jendrassika i Gröfa /55/.

Stężenie FFA badano w surowicy oraz w tkance wątrobowej. Przed oznaczeniem FFA w wątrobie, przeprowadzano ekstrakcję metodą Folcha i wsp. /25/. W tym celu pobrane tkanki ważono

i homogenizowano w homogenizatorze szklanym Potter-Elvehjema w mieszaninie chloroformu i metanolu w stosunku 2:1. Następnie wirowano, a nadsącz przemywano trzykrotnie mieszaniną chloroformu, metanolu i wody /3:47:48/. Końcową objętość płynu uzupełniano do 5 ml mieszaniną etanolu i eteru /3:1/ i odparowywano w temp. ok. 100°C do suchej pozostałości. Zawartość FFA w ekstrakcie tkankowym i surowicy krwi oznaczano metodą Ducombe'a /55/. Zasada tej metody polega na reakcji FFA z jonami miedzi, w wyniku czego powstają mydła miedziowe rozpuszczalne w chloroformie. Zawartość miedzi w mydłach oznaczano kolorymetrycznie przy użyciu dwuetylodwutiosiokarbaminianu sodowego, odczytując ekstynkcję przy długości fali 440 nm. Stężenie FFA obliczano na podstawie uzyskanych ekstynkcji próby badanej /E_B/ i próby wzorcowej /E_W/ wg wzoru /55/:

$$\text{FFA } \mu\text{M}/1000 \text{ ml}/ = \frac{E_B}{E_W} \cdot 1000$$

Poziom FFA w wątrobie przeliczano na 100 mg wilgotnej tkanki.

TG oznaczano w surowicy i wątrobie metodą Carlsona /55/. Tkanki ważono i homogenizowano w mieszaninie chloroformu i metanolu w stosunku 2:1. Homogenat, podobnie jak surowicę, uzupełniano do 5 ml metanolem, chloroformem i 0,9% NaCl. Następnie pozostawiano na 24 godziny w celu rozdzielenia faz. Do badań pobierano warstwę chloroformową, z której usuwano cholesterol i fosfolipidy przez wytrząsanie z kwasem krzemowym. W uzyskanym ekstrakcie oznaczano TG. W tym celu hydrolizowano je do wolnych kwasów tłuszczowych i gliceryny za pomocą etanolowego roztworu KOH w temp. 60°C. Powstałą glicerynę oznaczano kolorymetrycznie przy długości fali 570 nm, zaś

stężenie TG obliczano na podstawie uzyskanych wartości ekstynkcji próby badanej $/E_B/$ i próby wzorcowej $/E_W/$ przy uwzględnieniu stężenia wzorca $/0,1 \mu M/$, wg wzoru $/55/$:

$$TG \text{ } / \mu M / 1000 \text{ ml} / = \frac{E_B}{E_W} \cdot 0,1 \mu M \cdot 20000$$

Poziom TG w wątrobie przeliczano na 100 mg wilgotnej tkanki.

Cholesterol $/CH/$ w surowicy i tkance wątrobowej oznaczano metodą Chiamori'ego $/55/$. Zasada tej metody polega na tworzeniu barwnego kompleksu CH z trójchlorkiem żelazowym w obecności stężonego kwasu siarkowego. Tkanki przeznaczone do badań homogenizowano w mieszaninie etanolu i eteru w stosunku 3:1. Homogenat wirowano, a nadsącz odparowywano w temp. ok. $100^\circ C$. W ekstrakcie tkankowym i surowicy oznaczano CH kolorymetrycznie przy długości fali 560 nm. Stężenie CH obliczano na podstawie uzyskanych wartości ekstynkcji próby badanej $/E_B/$ i próby wzorcowej $/E_W/$, wg wzoru $/55/$:

$$CH \text{ } / mg\% / = \frac{E_B}{E_W} \cdot 400$$

Poziom CH w wątrobie przeliczano na 100 mg wilgotnej tkanki.

Badania histologiczne tkanki wątrobowej przeprowadzano po jej utrwaleniu przez 24 godziny w 10% roztworze zubożonej formaliny, przepłukaniu, odwodnieniu, przeprowadzeniu przez ksylen i zatopieniu w parafinie, a następnie pokrojeniu na mikrotomie na skrawki grubości 4-6 μ . Skrawki parafinowe wybarwiano w rutynowy sposób hematoksyliną i eozyną $/H+E/$ $/8,120/$.

Celem wykrycia obecności glikogenu w hepatocytach zastosowano metodę PAS w skrawkach parafinowych. W metodzie tej pod wpływem kwasu nadjodowego dochodzi do przekształcenia grup 1,2-glikolowych glikogenu w grupy aldehydowe, które reagują z leukofuksyną tworząc zasadę Schiffa. Ponieważ reakcja ta ujawnia w tkance poza glikogenem także inne węglowodany, dlatego też wykonywano dodatkowe kontrolne trawienie skrawków diastazą /8,82/.

Badanie histochemiczne tłuszczów w komórce wątrobowej wykonywano metodą barwienia mrożonych skrawków tkanki Sudanem III /120/.

Badano histochemicznie zachowanie się aktywności fosfatazy kwaśnej i β -glukuronidazy, enzymów będących markerami lizosomalnymi /82/. Skrawki utrwalano przez 18-22 godzin w zimnym /temp. $+4^{\circ}\text{C}$ / płynie Bakera /formol-calcium/. Następnie po opłukaniu w wodzie destylowanej przeprowadzano przez roztwór sacharozy i gumy akacjowej przez 24 godziny, zamrażano w izopentanie oziębionym w płynnym azocie i skrawano w kriostacie typu Slee /temp. -20°C / na skrawki grubości ok. 10 μ .

Reakcję na fosfatazę kwaśną przeprowadzano na skrawkach kriostatowych metodą Barki i Andersona /82/. Stosowano płyn inkubacyjny o pH 5,0, zawierający jako substrat reakcji fosforan naftolu AS-BI w buforze octanu weronału oraz stabilizowaną sól dwuazową /hexazonium pararosanilin/. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C , skrawki płukano, podbarwiano jądra komórkowe zielenią metylową i po odwodnieniu i prześwietleniu zamykano w Permount.

Reakcję na β -glukuronidazę przeprowadzano na skrawkach

kriostatowych metodą Hayashi /82/. Stosowano płyn inkubacyjny o pH 5,2, zawierający jako substrat glukuronian naftolu AS-BI w buforze octanowym oraz stabilizowaną sól dwuazową /hexazonium pararosanilin/. Po 60 minutach inkubacji w temp. 37°C, skrawki płukano, podbarwiano jądra komórkowe zielenią metylową i po przemyciu, odwodnieniu w alkoholu i ksylenie, zamykano w balsamie kanadyjskim.

Tkanekę wątrobową przeznaczoną do badania w mikroskopie elektronowym utrwalano w 2% aldehydzie glutarowym, buforowanym do pH 7,4 buforem kakodylowym, a następnie w 1% buforowanym czterotlenku osmu. Po odwodnieniu w szeregu alkoholi, materiał zatapiano w Eponie 812, skrawano na ultramikrotomie Tesla, a skrawki kontrastowano octanem uranylu oraz cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym transmisyjnym Tesla BS 500.

W celu prawidłowej interpretacji zebranych danych liczbowych wyliczano średnie arytmetyczne \bar{x} , odchylenie standardowe /SD/ i błąd standardowy średniej arytmetycznej /SEM/. Wyniki poddano analizie statystycznej posługując się ogólnie przyjętymi metodami z zastosowaniem następujących testów statystycznych: test istotności t - Studenta dla zmiennych niepołączonych celem porównania dwóch średnich w przypadku równych wariancji, test istotności "C" Cochrańa i Coxa dla porównania dwóch średnich w przypadku różnych wariancji, oraz test istotności "F" - Snedecora dla analizy wariancji /78/. Obliczenia przeprowadzono przy pomocy minikomputera statystycznego.

VI. W Y N I K I =====

Zachowanie się ciężaru ciała zwierząt, którym podawano przewlekłe disulfiram, disulfiram z alkoholem i sam alkohol, przedstawiono w tabeli 1. We wszystkich grupach doświadczalnych po upływie 6 tygodni obserwowano spadek średniego ciężaru ciała od 7 do 24,7% w porównaniu do ciężaru wyjściowego z tym, że różnice były znamienne statystycznie tylko u zwierząt, które otrzymały disulfiram dożyłkowo /antikol/ oraz antikol łącznie z alkoholem /grupa II, III i VI/.

Szczury, którym podawano antikol lub antikol łącznie z alkoholem były apatyczne, senne, niechętnie przyjmowały pokarm oraz miały lekką biegunkę. Skóra ich była blada i o niższej ciepłocie, zaś sierść nastroszona i pozbawiona połysku. Podobne objawy podają inni autorzy /11,54/. Przyjmuje się, że hypotermia jest typowym efektem działania disulfiramu u zwierząt /34/.

W przeciwieństwie do powyższych zmian, zwierzęta, które otrzymały disulfiram implantowany podskórnym /esperal/, alkohol oraz esperal łącznie z alkoholem nie różniły się zasadniczo w wyglądzie i zachowaniu od szczurów grupy kontrolnej.

Największą śmiertelność obserwowano w grupie szczurów, którym podawano antikol w dawce 300 mg/kg/dobę. W grupie tej 80% szczurów zginęło i takie same wyniki otrzymano powtarzając badania na tej samej liczbie zwierząt. Ponadto dużą śmiertel-

ność notowano u zwierząt otrzymujących antikol w dawce 150 mg/kg/dobę, a mianowicie zginęło 36% szczurów, zaś w grupie, która otrzymywała antikol łącznie z alkoholem padło 42% szczurów. Śmierć zwierząt była poprzedzona napadami gonitwy po klatce z następowym stanem kataleptycznym, charakteryzującym się wzmożonym napięciem i zeszywnieniem mięśni szkieletowych, przede wszystkim kończyn. Podobne zmiany w zachowaniu szczurów po disulfiramie obserwowali także inni autorzy /11, 54,84/.

Autopsja, wykonana po zabiciu szczurów i pobraniu materiału do badania, nie wykazała istotnych zmian makroskopowych w narządach wewnętrznych w badanych grupach, za wyjątkiem przekrwienia ściany żołądka i jelit zwierząt, które otrzymały antikol i antikol łącznie z alkoholem /grupa II, III i VI/. W grupach z wszczepionym esperalem /grupa IV i VII/, w miejscu gdzie wprowadzono lek podskórnym, u większości szczurów, bo u 75%, obserwowano przerosłą tkankę łączną i tłuszczową, bez obecności esperala. Natomiast u pozostałych 25% zwierząt stwierdzono lek otorbiony tkanką łączną, przy czym tabletką była o ok. 20-50% mniejsza od tabletki wszczepionej. Szczury te wyeliminowano z badań.

Tabela 2 przedstawia zachowanie się średniej aktywności ALAT, AspAT i AP w surowicy krwi w badanych grupach zwierząt. Jak z przedstawionych danych wynika, w grupie szczurów, którym podawano antikol w dawce 150 mg/kg/dobę /grupa II/ oraz 300 mg/kg/dobę /grupa III/, stwierdzono w porównaniu z grupą kontrolną statystycznie znacząco wyższą aktywność ALAT / $p < 0,05$ /, która wynosiła odpowiednio $42,7 \pm 1,6$ mU/ml / $\bar{x} \pm SEM$ /

w grupie I, $58,0 \pm 3,1$ mU/ml w grupie II i $69,8 \pm 2,9$ mU/ml w grupie III. Również w grupie otrzymującej antykol łącznie z alkoholem /grupa VI/ w porównaniu z grupą kontrolną stwierdzono istotny wzrost aktywności ALAT / $53,8 \pm 3,1$ mU/ml/. Natomiast po podaniu esperalu /grupa IV/ oraz samego alkoholu /grupa V/, jak również esperalu i alkoholu łącznie /grupa VII/, nie wykazano większych różnic w zachowaniu się surowiczej aktywności ALAT w porównaniu z grupą kontrolną.

Statystycznie znamienne wyższą aktywność ALAT w surowicy stwierdzono w grupie III w porównaniu z grupą II, IV, V, VI i VII. Natomiast porównanie średnich wartości ALAT pomiędzy pozostałymi grupami nie wykazało istotnych statystycznie różnic.

We wszystkich grupach średnia aktywność AspAT była wyższa od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, lecz znamienne statystycznie różnice stwierdzono jedynie w grupie otrzymującej antykol w dawce 300 mg/kg/dobę /grupa III/. Natomiast porównanie średnich aktywności AspAT pomiędzy poszczególnymi grupami nie ujawniło istotnych statystycznie różnic.

Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 2, zarówno przewlekłe dożołądkowe podawanie antykołu w dawce 150 mg/kg/dobę oraz w dawce 300 mg/kg/dobę, jak i przewlekłe podawanie alkoholu, alkoholu z antykołem i alkoholu z esperalem, wywołuje w porównaniu z grupą kontrolną statystycznie znamienne wzrost surowiczej aktywności AP. Natomiast nie obserwowano znamienych różnic w zachowaniu się aktywności AP pomiędzy poszczególnymi grupami.

Średnia aktywność ChE w surowicy szczurów kontrolnych wynosiła $460,0 \pm 28,8$ mU/ml / $\bar{x} \pm SEM$ / /tabela 3/, była

natomiast niższa we wszystkich pozostałych grupach zwierząt z tym, że statystycznie znamienne niższą aktywność obserwowano u szczurów otrzymujących antikol /grupa II i III/, alkohol /grupa V/ i alkohol z antikolem /grupa VI/. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w zachowaniu się ChE pomiędzy grupą III i IV oraz IV i V.

Stężenie bilirubiny całkowitej w surowicy szczurów grupy kontrolnej wynosiło $0,30 \pm 0,07$ mg% /tabela 3/ i było statystycznie znamienne wyższe w grupie otrzymującej antikol w dawce 300 mg/kg/dobę /grupa III/. Ponadto stwierdzono istotnie wyższy surowiczy poziom bilirubiny w grupie III w stosunku do wartości obserwowanej w grupie II.

W homogenatach tkanki wątrobowej zwierząt kontrolnych średnie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych /FFA/ wynosiło $2,30 \pm 0,14$ μ M/100 mg / $\bar{x} \pm$ SEM / /tabela 4/. Statystycznie znamienne spadki poziomu FFA zanotowano w grupach otrzymujących antikol zarówno w dawce 150 mg/kg/dobę /grupa II/ jak i w dawce 300 mg/kg/dobę /grupa III/, zaś statystycznie istotny wzrost stężenia FFA wykazano w grupie otrzymującej alkohol /grupa V/. Ponadto stwierdzono znamienne wyższe stężenie FFA w tkance wątrobowej w grupie V w stosunku do stężenia w grupie II, III i IV, w grupie VI w stosunku do grupy II i III oraz w grupie VII w stosunku do poziomu FFA w grupie II i III.

Natomiast stężenie FFA w surowicy zwierząt wykazało duże wahania. Było ono we wszystkich grupach, za wyjątkiem grupy VI, wyższe od wartości wyznaczonych dla grupy kontrolnej, jednak analiza statystyczna tych danych nie wykazała znamienności tych różnic /tabela 4/.

Jak wynika z tabeli 5 przedstawiającej zachowanie się stężenia trójglicerydów /TG/ w homogenatach tkanki wątrobowej, średnie stężenie TG w grupie kontrolnej wynosiło $0,61 \pm 0,03$ $\mu\text{M}/100$ mg. Znamiennego wzrostu TG obserwowano w wątrobie szczurów otrzymujących antykol w dawce 150 mg/kg/dobę /grupa II/ oraz w dawce 300 mg/kg/dobę /grupa III/, a także w grupie otrzymującej alkohol /grupa V/ i esperal łącznie z alkoholem /grupa VII/.

W surowicy szczurów kontrolnych średnie stężenie TG wynosiło $1709, 1 \pm 8,6$ $\mu\text{M}/1000$ ml /tabela 5/. W pozostałych grupach badanych występował wzrost stężenia surowiczego TG z tym, że różnice statystycznie / $p < 0,05$ / stwierdzono w obu grupach otrzymujących antykol /grupa II i III/ oraz w grupie otrzymującej alkohol /grupa V/ i antykol łącznie z alkoholem /grupa VI/ / $p < 0,01$ /. Natomiast porównanie zachowania się stężenia TG w surowicy w poszczególnych grupach zwierząt nie wykazało znamienych różnic za wyjątkiem wyższego poziomu TG w grupie VI w stosunku do grupy IV.

Zachowanie się stężenia cholesterolu /CH/ w homogenatach wątrobowych przedstawiono w tabeli 6. Jak z tych danych wynika, stężenie CH w grupie kontrolnej wynosiło $3,60 \pm 0,18$ mg/g. W grupie otrzymującej alkohol i esperal łącznie z alkoholem średnie stężenie CH było statystycznie znamienne wyższe / $p < 0,05$ / od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. Natomiast w grupie szczurów otrzymujących antykol w dawce 300 mg/kg/dobę /grupa III/ i antykol łącznie z alkoholem /grupa VI/ w porównaniu z grupą I, tzn. kontrolną, obserwowano istotny statystycznie spadek stężenia CH. Ponadto stwierdzono

znamiennie statystycznie niższe stężenie CH w tkance wątrobowej w grupie III w stosunku do stężenia w grupie V oraz wyższe w grupie VII w stosunku do poziomów CH w grupie II, III i VI.

W surowicy szczurów kontrolnych średnie stężenie CH wynosiło $44,11 \pm 2,09$ mg% /tabela 6/. We wszystkich pozostałych grupach badanych stwierdzono znamienne statystycznie wzrost poziomu CH w surowicy, za wyjątkiem grupy IV, otrzymującej esperal, w której w porównaniu z grupą kontrolną, nie obserwowano różnicy w zachowaniu się średniego stężenia CH / $p > 0,05$ /.

Badanie histologiczne skrawków wątrobowych zwierząt grupy kontrolnej wykazało obraz prawidłowy /ryc. 1 A/. Zawartość glikogenu w tkance była niezmienną, a jedynie w nielicznych zrazikach zmniejszona. Barwienie Sudanem III na obecność tłuszczów w wątrobie wypadło u wszystkich zwierząt ujemnie. Odczyny histochemiczne na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę uwidocznily regularne rozmieszczenie lizosomów wzdłuż kanalików żółciowych na biegunie wydzielniczym komórek wątrobowych /ryc. 2 A, 3 A, 5 A/.

W grupie zwierząt otrzymujących antikol w dawce 150 mg/kg/dobę, budowa zrazikowa wątroby była utrzymana z zaznaczoną we wszystkich przypadkach grubowatością cytoplazmy, najsilniej wyrażoną w II i III strefie gronka wątrobowego Rappaporta /ryc. 1 B/. We wszystkich skrawkach obserwowano wyraźny spadek zawartości glikogenu, zaś barwienie na tłuszcze Sudanem III wypadło ujemnie. Reakcje histochemiczne na fosfatazę kwaśną uwidocznily w większości przypadków skupianie się lizosomów w strefie okołojądrowej, a więc zaburzenie biegunowości

hepatocytów. Ponadto odczyn ten był rozmyty i w III strefie gronka wyraźnie osłabiony. Reakcje na β -glukuronidazę wypadły podobnie i były wyraźnie słabsze w II i III strefie gronka /ryc. 2 B, 4 A, 5 B/.

W grupie zwierząt otrzymujących antikol w dawce 300 mg/kg/dobę, obraz histologiczny wątroby był podobny do opisanego w poprzedniej grupie z tym, że grudowatość cytoplazmy hepatocytów była silniej wyrażona. Ponadto część zwierząt /ok. 40%/ wykazywała obecność zwyrodnienia wodniczkowego cytoplazmy /ryc. 1 C, D/, zaś część /ok. 30%/ martwicę kwasochłonną sporadycznych komórek wątrobowych. Barwienie metodą PAS ujawniło rozlany, znaczny ubytek glikogenu, zaś barwienie Sudanem III wypadło ujemnie. Reakcje histochemiczne na fosfatazę kwaśną uwidoczniły we wszystkich przypadkach skupianie się lizosomów w strefie okołojądrowej, a więc zaburzenie biegunowości hepatocytów, ponadto odczyn ten był rozlany i osłabiony w III strefie gronka. U około 20% zwierząt stwierdzono obecność pojedynczych, dużych lizosomów, odpowiadających cytosegrosomom /ryc. 2 C, 3 B/. Odczyn na β -glukuronidazę wypadł podobnie do odczynu na fosfatazę kwaśną i był wyraźnie słabszy w II i III strefie gronka wątrobowego.

W grupie szczurów, którym wszczepiono esperal, budowa histologiczna wątroby była utrzymana, jedynie w II i III strefie gronka Rappaporta cytoplazma wykazywała grudkowatość. Barwienie PAS ujawniło ubytek glikogenu w hepatocytach, szczególnie wyraźny w II i III strefie gronka. Barwienie na tłuszcze wypadło ujemnie. Odczyny na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę wykazały tylko u części /ok. 15%/ zwierząt niewielkie

osłabienie tych odczynów, z zaburzeniem biegunowości hepatocytów oraz nasileniem ich w komórkach Browicza-Kupffera /ryc. 5 C/.

W grupie szczurów otrzymujących alkohol, budowa zrazikowa wątroby była utrzymana, jedynie w III strefie gronka wątrobowego cytoplazma wykazywała grudkowatość. Stwierdzono ubytek glikogenu w komórkach, zaś barwienie Sudanem III w pojedynczych komórkach w obrębie III strefy gronka dało wynik dodatni. Odczyny na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę uwiocznily osłabienie odczynu z zatarciem biegunowości hepatocytów /ryc. 4 B/.

W grupie zwierząt otrzymujących antikol / 150 mg/kg/ /dobę / łącznie z alkoholem, budowa histologiczna wątroby była zachowana. Zaznaczoną grudowatość cytoplazmy obserwowano głównie w II i III strefie gronka. Barwienie PAS i Sudanem III wypadło ujemnie. Reakcje na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę ujawniły zaburzenie biegunowości hepatocytów z osłabieniem odczynów w II i III strefie gronka /ryc. 4 C/, a więc obraz enzymo-morfologiczny zbliżony do uzyskanego po samym antikolu.

W grupie szczurów, którym wszczepiano esperal i podawano alkohol, zmiany histologiczne wątroby były identyczne jak w grupie zwierząt, którym podawano sam alkohol. Również barwienie PAS na glikogen i Sudanem III na tłuszcze oraz reakcje histochemiczne na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę - zachowywały się podobnie.

Obraz elektronowy komórek wątrobowych szczurów, które otrzymywały przewlekle dożołądkowo disulfiram w dawce 150 mg/

/kg/dobę wykazał zmniejszoną zawartość glikogenu w hialoplazmie /ryc. 11, 12/. Glikogen miał zmieniony obraz rozet i gromadził się głównie w naczyniowym biegunie hepatocytów. Obserwowano zmniejszenie ilości szorstkiej siateczki śródplazmatycznej o falistym przebiegu błon oraz znaczny wzrost ilości siateczki gładkościennej z miejscami zaznaczonym poszerzeniem jej kanałów /ryc. 11/.

Mitochondria rozmieszczone były dość nieregularnie, niektóre z nich były wydłużone, niektóre rozdęte, niekiedy jedynie odcinkowo. W miejscach rozdęcia obserwowano przemieszczenie grzebieni oraz ich destrukcję. Macierz mitochondrialna ujawniała niejednorodną gęstość elektronową i była zmniejszona głównie w partiach rozdętych. W obrębie niektórych mitochondriów występowały figury mielinowe /ryc. 11/. Zwracała uwagę zwiększona ilość peroksysomów, porozrzucanych nieregularnie w hialoplazmie komórek wątrobowych, z obecnymi wewnątrz elektronowo-gęstymi nukleoidami /ryc. 12/. Lizosomy były zlokalizowane w niektórych hepatocytach w pobliżu kanałika żółciowego /ryc. 11/, w niektórych zaś były powiększone i przemieszczone do okolicy przyjądrowej.

U szczurów otrzymujących przewlekle dożołądkowo disulfiram / 150 mg/kg/dobę / z alkoholem stwierdzono znaczne zmniejszenie ilości glikogenu oraz obecność pojedynczych kropli lipidowych w obrębie hialoplazmy komórek wątrobowych /ryc. 13/. Siateczka śródplazmatyczna szorstka była mniej licznie reprezentowana i rozmieszczona w sposób nieuporządkowany, ponadto wykazywała przebieg falisty i zaznaczone rozdęcie kanałów. Siateczka gładkościenna wykazywała wybitny

wzrost ilościowy, a jej kanały cechowały się znacznym poszerzeniem. Macierz mitochondrialną znamionowała znaczna gęstość elektronowa, a zmienna gęstość elektronowa nadawała niektórym pstry wejrzenie. W obrębie niektórych mitochondriów występowały figury mielinowe. Lizosomy były zlokalizowane w większości komórek wątrobowych w okolicy przyjądrowej /rys. 13/.

Obraz elektronowy hepatocytów szczurów otrzymujących alkohol wykazywał obecność dość licznych, różnej wielkości kropli lipidowych w obrębie hialoplazmy, która cechowała się ponadto znaczną zawartością równomiernie rozmieszczonego glikogenu /ryc. 14,15/. Siateczka śródplazmatyczna gładka była pomnożona, a jej kanały w wielu hepatocytach znacznie rozdęte /ryc. 15/. Równocześnie obserwowano spadek zawartości siateczki szorstkiej. Mitochondria ujawniły zmiany strukturalne w postaci ich rozdęcia i powiększenia, zaś macierz mitochondrialna była niejednorodnie elektronowo gęsta /ryc. 14/. Stwierdzono pojedyncze, zawierające lipofuscynę lizosomy, zlokalizowane w części hepatocytów w pobliżu kanalika żółciowego, w części zaś w okolicy przyjądrowej. W niektórych komórkach wątrobowych obserwowano poszerzone kanaliki żółciowe, odcinkowo pozbawione mikrokosmków /ryc. 14/.

Zwierzęta z uszkodzoną wątrobą D-galaktozaminą i otrzymujące przez okres 3 dni disulfiram /antikol/ w dawce 600 mg/kg/dobę nie wykazywały istotnych statystycznie różnic w ciężarze ciała w porównaniu z grupą kontrolną, jakkolwiek spostrzegano jego nieznaczny spadek we wszystkich badanych grupach.

Zwierzęta obserwowane w tym doświadczeniu były apatyczne i senne, ponadto te, które otrzymały sam antikol oraz D-galaktozaminę z antikolem były wiotkie, a ciepłota ciała niższa od obserwowanej w pozostałych grupach.

W grupach szczurów, które otrzymały antikol oraz antikol łącznie z D-galaktozaminą /grupa II i IV/, autopsja wykazała uogólnione przekrwienie narządów wewnętrznych, obrzękłe ściany przewodu pokarmowego, żołądek był znacznie rozdęty i wypełniony śluzowo-kaszowatymi bezoarami o kwaśnym zapachu. Błona śluzowa części gruczołowej żołądka była wyraźnie przekrwiona z obecnymi miejscami wybroczynkami krwawymi.

W grupie szczurów otrzymujących D-galaktozaminę oraz D-galaktozaminę z antikolem /grupy III i IV/, stwierdzono podczas autopsji wyraźne przekrwienie wątroby.

Jak wynika z zamieszczonych w tabeli 7 danych, średnia aktywność ALAT w surowicy szczurów utrzymywała się na wyższym poziomie we wszystkich badanych grupach zwierząt w stosunku do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Statystycznie znamienne wzrost / $p < 0,001$ / surowiczej aktywności ALAT stwierdzono w grupie szczurów z D-galaktozaminowym uszkodzeniem wątroby /grupa III/ oraz u zwierząt, które otrzymywały antikol po uprzednim uszkodzeniu wątroby D-galaktozaminą /grupa IV/. Ponadto porównanie średnich surowiczych aktywności ALAT obu grup z D-galaktozaminowym uszkodzeniem wątroby /grupa III i IV/ wykazało u szczurów, którym dodatkowo podawano antikol /grupa IV/, znamienne statystycznie wzrost aktywności tego enzymu.

Średnia aktywność ALAT w homogenatach tkanki wątrobowej szczurów była znamienne niższa u zwierząt grupy III i IV. w porównaniu z grupą kontrolną / $p < 0,05$ / /tabela 7/.

Tabela 8 przedstawia zachowanie się aktywności AspAT w surowicy i w homogenatach wątrobowych badanych szczurów. Jak z danych tych wynika, w grupie zwierząt otrzymujących D-galaktozaminę i D-galaktozaminę z antikolem obserwowano wysoce znamienne wzrost aktywności AspAT w surowicy / $p < 0,001$ / w porównaniu z grupą kontrolną, czemu towarzyszył statystycznie znamienne / $p < 0,05$ / spadek aktywności tego enzymu w homogenatach wątrobowych. Natomiast porównanie średnich wartości AspAT uzyskanych zarówno w surowicy jak i tkance wątrobowej w grupie III i IV nie ujawniło znamienych różnic.

Średnia aktywność AP w surowicy zwierząt kontrolnych wynosiła $195,4 \pm 10,8$ mU/ml /tabela 9/ i w pozostałych badanych grupach była statystycznie znamienne wyższa. W homogenatach wątrobowych szczurów kontrolnych aktywność AP wynosiła $0,85 \pm 0,08$ mU/mg /tabela 9/ i była w grupie III i IV znamienne wyższa / $p < 0,01$ /. Natomiast nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w zachowaniu się aktywności AP w surowicy i tkance wątrobowej pomiędzy grupami III i IV.

Wyniki badań aktywności ChE w surowicy przedstawiono w tabeli 10. W porównaniu do wartości ChE grupy kontrolnej, która wynosiła $486,0 \pm 14,2$ mU/ml, u wszystkich badanych zwierząt stwierdzono spadek surowiczej aktywności tego enzymu / $p < 0,05$ /. Również w homogenatach tkanki wątrobowej obserwowano w porównaniu z grupą kontrolną spadek średniej aktywności ChE z tym, że znamienne statystycznie spadek dotyczył jedynie

grupy II i III /tabela 10/. Nie stwierdzono istotnych różnic w surowiczej i wątrobowej aktywności ChE w grupach III i IV.

Jak wynika z tabeli 11, w grupie szczurów otrzymujących D-galaktozaminę /grupa III/ oraz D-galaktozaminę z antikolem /grupa IV/, obserwowano znaczny, statystycznie znamieny wzrost stężenia bilirubiny całkowitej w surowicy w porównaniu do stężenia stwierdzonego w grupie kontrolnej /odpowiednio $p < 0,01$ i $p < 0,005$ /. Ponadto porównanie średniego stężenia bilirubiny w surowicy szczurów w obu grupach z D-galaktozaminowym uszkodzeniem wątroby /grupa III i IV/ wykazało u zwierząt, którym dodatkowo podawano antikol /grupa IV/ znamieny statystycznie wzrost stężenia bilirubiny.

Badanie histologiczne skrawków wątroby zwierząt grupy kontrolnej wykazało obraz prawidłowy /ryc. 6 A/. Zawartość glikogenu w tkance była niezmienną, jedynie w sporadycznych zrazikach zmniejszona. Barwienie Sudanem III na obecność tłuszczów w wątrobie wypadło u wszystkich zwierząt ujemnie. Odczyny histochemiczne na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę uwidoczniały regularne rozmieszczenie lizosomów wzdłuż kanałków żółciowych na biegunie wydzielniczym komórek wątrobowych /ryc. 8 A/.

W grupie zwierząt otrzymujących antikol w dawce 600 mg/kg/dobę przez 3 dni, stwierdzono w obrazie histologicznym wątroby nierównomierną barwliwość i grudowatość cytoplazmy u wszystkich zwierząt /ryc. 6 B/. Ponadto u większości szczurów obserwowano wakuolizację cytoplazmy. We wszystkich przypadkach występował wyraźny spadek zawartości glikogenu, zaś barwienie na tłuszcze wypadło u wszystkich zwierząt ujemnie.

Odczyny histochemiczne zarówno na fosfatazę kwaśną jak i β -glukuronidazę były w części hepatocytów osłabione, czemu towarzyszyło zaznaczone zaburzenie biegunowego układu lizosomów. Osłabienie i rozmycie /odczyn dyfuzyjny/ obu odczynów stwierdzono zwłaszcza w centrum i strefie pośredniej zrazików wątrobowych, gdzie zaznaczała się utrata biegunowości hepatocytów i gdzie występowały ponadto duże lizosomy, odpowiadające cytosegrosomom /ryc. 8 B i C oraz ryc. 9 A/. Na obwodzie zrazików obserwowano skupianie się lizosomów w większe konglomeraty.

W grupie szczurów otrzymujących D-galaktozaminę badanie histologiczne ujawniło obraz uszkodzenia wątroby w postaci rozsianej kwasochłonnej martwicy komórek wątrobowych z naciekami zapalnymi złożonymi głównie z komórek jednojądrzastych limfocytopodobnych /ryc. 6 C/ zlokalizowanymi w przestrzeniach wrotnych oraz w ich pobliżu. Zmiany histologiczne w wątrobie szczurów odpowiadały opisywanym obrazom "galactosmin^a hepatitis" /41,89/. Ilość glikogenu w wątrobie była zmniejszona u wszystkich zwierząt, a barwienie na tłuszcze Sudanem III wypadło ujemnie. Reakcje histochemiczne na fosfatazę kwaśną i β -glukuronidazę wykazały utrzymaną biegunowość komórek wątrobowych w centrum zrazika, natomiast w obwodowych jego obszarach, a zwłaszcza w pobliżu nacieków zapalnych w rejonie przestrzeni wrotnych, obserwowano zatarcie biegunowości komórkowej i liczne cytosegrosomy /ryc. 9 B i C/. Ponadto w naciekach zapalnych obecnych było dużo makrofagów z silnie dodatnimi odczynami zarówno na fosfatazę kwaśną jak i na β -glukuronidazę.

W grupie zwierząt otrzymujących antykol po uprzednim wywołaniu D-galaktozaminowego uszkodzenia wątroby, zmiany histologiczne były podobne do obserwowanych u szczurów, które otrzymały samą D-galaktozaminę. Tak więc stwierdzono rozsiałą martwicę kwasochłonną hepatocytów oraz obecność nacieków zapalnych w przestrzeniach wrotnych i w ich pobliżu. Niemniej jednak u ok. 30% szczurów zmiany były bardziej nasilone, przy czym obserwowano miejscami obszary masywnej martwicy i wylewów krwawych /ryc. 7 A, B i C/. Ilość glikogenu była zmniejszona u wszystkich zwierząt, natomiast barwienie Sudanem III na obecność tłuszczu u 40% szczurów ujawniło stłuszczenie wątroby. Reakcje histochemiczne na fosfatazę kwaśną były w niewielkiej części hepatocytów utrzymane, ale w większości komórek wątrobowych odczyn był rozproszony lub rozmyty /odczyn dyfuzyjny/ oraz wykazywał obecność licznych dużych lizosomów odpowiadających cytosegrosomom. W makrofagach reakcje na fosfatazę kwaśną były znacznie nasilone /ryc. 10 A i B/. Podobnie zachowywały się odczyny na β -glukuronidazę, chociaż były słabiej wyrażone.

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW =====

Przedstawione badania potwierdziły obserwowane również przez innych autorów /11,34,54,84/ ogólne toksyczne oddziaływanie na zwierzęta przewlekle dożołądkowo podawanego disulfiramu. Objawiało się ono spadkiem ciężaru ciała szczurów, zmianami w ich wyglądzie zewnętrznym i zachowaniu z obniżeniem ruchliwości i hypotermią, a w wyższych dawkach śmiercią większości zwierząt.

Objawy powyższe były zapewne spowodowane toksycznym wpływem disulfiramu na centralny system nerwowy zwierząt. Zostało bowiem stwierdzone /17,53,96/, że lek ten, blokując beta-hydroksylazę dopaminową w zakończeniach nerwowych, hamuje biosyntezę amin biogennych, a przewlekle stosowany prowadzi do demielinizacji, a więc uszkodzenia włókien nerwowych /85/.

Zasadniczym celem pracy było przede wszystkim określenie wpływu disulfiramu na wątrobę badanych zwierząt.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na hepatotoksyczne działanie przewlekle podawanego disulfiramu. Ujawniło się ono zarówno w wynikach badań biochemicznych jak i morfologicznych.

Tak więc disulfiram /Anticol/ podawany dożołądkowo szczurom w dawkach dobowych 150 mg/kg i 300 mg/kg przez okres 6 tygodni powodował statystycznie znamienne wzrost surowiczej

aktywności ALAT oraz fosfatazy alkalicznej i ponadto znamienne obniżenie aktywności ChE. Należy tu podkreślić, że wspomniane zmiany biochemiczne obserwowano u większości badanych zwierząt, przy czym ich nasilenie zależało od wielkości dawki, co również w pewnym stopniu stanowi potwierdzenie właściwości hepatotoksycznych disulfiram.

Tak więc nasilenie zmian wątrobowych pod wpływem wyższych dawek disulfiram wyrażało się statystycznie znamienne wyższą aktywnością ALAT oraz wyższym stężeniem bilirubiny w surowicy zwierząt, którym podawano disulfiram w dawce 300 mg/kg, w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie, której podawano lek w niższej dawce dobowej, a więc 150 mg/kg.

Ponadto wyższe dawki disulfiram wywoływały znamienne wzrost aktywności AspAT w surowicy, czego nie obserwowano po podaniu niższych dawek tego leku.

Preparat disulfiram o przedłużonym działaniu implantowany podskórnie /Espéral/ nie prowadził do wspomnianych zmian biochemicznych, a stosowany łącznie z alkoholem powodował takie same zmiany jak sam alkohol.

Jak wspomniano w części wstępnej, disulfiram jest lekiem źle rozpuszczalnym w wodzie i jak wykazali m.in. Boss i wsp. /6/ oraz Sauter i wsp. /95/ jego wchłanianie z miejsca wszczepienia jest osobniczo zmienne i wydaje się być problematyczne /6,43,52,69,100,109,115/. Powyższe dane mogą tłumaczyć brak występowania biochemicznych cech uszkodzenia wątroby u zwierząt, którym implantowano Espéral.

W grupie zwierząt otrzymujących przewlekle sam alkohol stwierdzono w porównaniu z grupą kontrolną jedynie statystycznie

znamienny wzrost surowiczej aktywności fosfatazy alkalicznej i spadek ChE, natomiast nie obserwowano wzrostu poziomu bilirubiny i istotnych zmian w zachowaniu się aminotransferaz.

Disulfiram podawany w dawce 300 mg/kg wywoływał statystycznie znamienny wzrost surowiczej aktywności ALAT w porównaniu nie tylko z grupą zwierząt otrzymujących sam disulfiram w dawce 150 mg/kg, sam alkohol oraz sam Espéral, ale również w porównaniu z grupą, która otrzymywała disulfiram /150 mg/kg/ łącznie z alkoholem.

W grupie zwierząt, która otrzymywała disulfiram /150 mg/kg/ łącznie z alkoholem, nie obserwowano statystycznie znamiennych różnic w aktywności badanych enzymów i w surowiczym poziomie bilirubiny w stosunku do grupy, której podawano sam disulfiram w dawce 150 mg/kg i sam alkohol.

Fakt ten świadczy o tym, że łączne podawanie disulfiramu z alkoholem nie prowadzi do sumowania się wpływu toksycznego obu tych substancji, a również stanowić może argument przemawiający za tym, że zapewne w działaniu hepatotoksycznym disulfiramu nie odgrywa podstawowej roli aldehyd octowy. Zaznaczyć należy, że aldehyd octowy jest substancją wybitnie toksyczną /10,105/. Hamuje on m.in. fosforylację oksydacyjną w hepatocytach i w konsekwencji może zaburzyć funkcję i strukturę komórki /10,101,105,113/.

Wnioski dotyczące hepatotoksyczności disulfiramu, wysunięte na podstawie wyników oznaczeń biochemicznych, znalazły potwierdzenie w badaniach morfologicznych i histochemicznych wątroby badanych zwierząt.

Stwierdzono mianowicie w wątrobie szczurów, którym podawano disulfiram w dawce 150 mg/kg i 300 mg/kg grudowatość cytoplazmy komórek wątrobowych, ubytek w nich glikogenu, rozmycie i osłabienie odczynów histochemicznych na markery lizosomalne, a więc fosfatazę kwaśną i beta-glukuronidazę, z towarzyszącym zatarciem biegunowości komórek. Ponadto w obrazach mikroskopu elektronowego obserwowano zmniejszenie ilości siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, pomnożenie gładkiej, zmiany kształtu mitochondriów ze zmniejszeniem gęstości elektronowej macierzy i pojawianie się w ich obrębie figur mielinowych, ponadto obecność licznych peroksosomów oraz przemieszczenie lizosomów do strefy okołojądrowej.

Badania morfologiczne wątroby zwierząt, które otrzymały disulfiram w dawce 300 mg/kg ujawniły zwiększone nasilenie przedstawionych powyżej zmian, a ponadto pojawienie się zwyrodnienia wodniczkowego cytoplazmy, martwicy kwasochłonnej komórek wątrobowych oraz występowanie dużych lizosomów, odpowiadających cytosegrosomom /13/.

Alkohol podawany przewlekłe wywoływał zmiany morfologiczne w wątrobie, zbliżone do opisanych po disulfiramicie podawanym w dawce 150 mg/kg. Tak więc stwierdzono grudowatość cytoplazmy, ubytek glikogenu, osłabienie odczynów histochemicznych na markery lizosomalne, z przemieszczeniem lizosomów do strefy okołojądrowej. Zmiany te dotyczyły głównie komórek wątrobowych III strefy gronka Rappaporta /88/, gdzie obserwowano również dodatnie odczyny na tłuszcze, zaś w mikroskopie elektronowym obecność licznych kropli lipidowych, pomnożenie i poszerzenie gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz zmiany

kształtu mitochondriów /58,83,91/. Natomiast po disulfiramie zmiany występowały w hepatocytach II i III strefy gronka.

Równoczesne podawanie disulfiramu z alkoholem prowadziło do zmian morfologicznych zbliżonych do tych, które stwierdzono w grupie zwierząt, którym podawano sam disulfiram w dawce 150 mg/kg z tym, że poza występującymi po samym disulfiramie zmianami w zakresie lizosomów, mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej, obserwowano tu obecność kropli lipidowych w hepatocytach.

Disulfiram implantowany podskórnie /Espéral/ powodował grudowatość cytoplazmy i ubytek glikogenu w komórkach wątrobowych II i III strefy gronka oraz u części zwierząt zaburzenie biegunowości hepatocytów z niewielkim osłabieniem odczynów na fosfatazę kwaśną i beta-glukuronidazę. Espéral stosowany łącznie z alkoholem wywoływał zmiany takie same jak przy podawaniu samego alkoholu.

Należy podkreślić, że o ile obserwowany w komórkach wątrobowych szczurów, które otrzymywały przewlekle disulfiram lub sam alkohol, spadek zawartości glikogenu, osłabienie odczynów histochemicznych na fosfatazę kwaśną i beta-glukuronidazę, przemieszczenie lizosomów do strefy okołojądrowej, spadek ilości szorstkiej i wzrost gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz pomnożenie peroksosomów - mogą być interpretowane jako morfologiczny wyraz adaptacji do zmian metabolicznych związanych z przemianą tych substancji /47,91,106,110/, to obserwowana wyłącznie po wyższych dawkach disulfiramu martwica kwasochłonna, zwyrodnienie wodniczkowe cytoplazmy, pojawianie się cytosegrosomów oraz zmiany struktury mitochondriów

z obecnością w ich obrębie figur mielinowych, stanowią niewątpliwie wyraz toksycznego uszkodzenia komórki wątrobowej przez disulfiram /47/.

Dodać należy, że przewlekłe dożołądkowo podawany disulfiram wywoływał zmiany morfologiczne komórek wątrobowych podobne do tych zmian, które obserwowano po dużych dawkach tego leku podawanego w ostrym doświadczeniu /47/.

Tak więc przeprowadzone badania potwierdzają zasadniczo wnioski wynikające z doświadczenia ostrego /47/ wskazując na toksyczne oddziaływanie tego leku na wątrobę. Podkreśleniu zasługuje fakt, że przewlekłe podawany disulfiram stanowił o tyle lepszy model dla określenia jego hepatotoksyczności, ponieważ odpowiadał sposobowi stosowania tego leku w warunkach klinicznych.

W uzupełnieniu powyżej dyskutowanych badań nad wpływem disulfiramu na wątrobę wykazano, że lek ten ujawnia działanie hepatotoksyczne również u szczurów z uszkodzoną uprzednio wątrobą D-galaktozaminą.

D-galaktozamina, jak wiadomo z licznych doniesień /41, 42,60,74,89/, wywołuje u zwierząt laboratoryjnych zapalenie wątroby zbliżone morfologicznie do zapalenia tego narządu obserwowanego u ludzi /41/. Pionierskie prace z tego zakresu Kepplera, Lescha, Reuttera, Deckera oraz Medline i wsp. /41, 42,60,74,89/ wyjaśniły patomechanizm tych zmian. Metabolity D-galaktozaminy łącząc się z nukleotydami uracylowymi hamują ich czynność, doprowadzając do zaburzenia biosyntezy RNA, białek, glikoprotein i glikolipidów, uszkodzenia organelli komórkowych, takich jak lizosomy, mitochondria, siateczka

śródpłazmatyczna, błony komórkowe, aparat Golgiego oraz rozwoju nacieków zapalnych w przestrzeniach wrotnych wątroby.

Podanie disulfiram u zwierzętom z uprzednio uszkodzoną wątrobą D-galaktozaminą wywoływało dodatkowo, nie obserwowane po samej D-galaktozaminie, stłuszczenie wątroby i masywną martwicę części komórek z wylewami krwawymi, ponadto stwierdzono obecność licznych cytosegrosomów oraz rozmycie odczynów histochemicznych na markery lizosomalne fosfatazę kwaśną i beta-glukuronidazę. Również wyniki badań biochemicznych wskazywały na nasilenie uszkodzenia wątroby. Wykazano mianowicie statystycznie istotny wzrost aktywności ALAT i stężenia bilirubiny w surowicy tych zwierząt, w porównaniu do wartości powyższych oznaczeń uzyskanych u szczurów z uszkodzoną wątrobą samą D-galaktozaminą.

Mechanizm hepatotoksyczności disulfiram nie został w pełni wyjaśniony. W oparciu o dane z piśmiennictwa przedstawione we wstępie, możnaby przyjąć, że mechanizm ten jest związany z hamowaniem przez disulfiram czynności enzymów wewnątrzkomórkowych i biosyntezy białka /14,28,49,54,73,90,96,99,121,123/, co w konsekwencji prowadzi do zmian struktury komórek wątrobowych /106/. Być może, że o działaniu hepatotoksycznym disulfiram decydują głównie cytotoksyczne właściwości metabolitów disulfiram, a w szczególności dwusiarczku węgla /CS₂/ /29,39,85,86,93,117/, o czym również wspomniano we wstępnej części pracy.

W uzupełnieniu przedstawionych badań biochemicznych i morfologicznych przeprowadzono badania nad zachowaniem się przemiany tłuszczowej u szczurów przewlekłe otrzymujących disulfiram, alkohol oraz oba te związki łącznie.

Wątroba jak wiadomo zajmuje centralne miejsce w gospodarce lipidowej. Również w tym narządzie ulegają biotransformacji substancje egzogenne, m.in. alkohol i szereg leków, z których wiele prowadzi do zaburzenia wątrobowej przemiany tłuszczowej /4,44,45,73/, znajdującej wyraz morfologiczny pojawianiem się stłuszczenia komórek wątrobowych.

Stosunkowo najlepiej poznano poalkoholowe zaburzenia metabolizmu tłuszczów. Tak więc alkohol hamuje utlenianie kwasów tłuszczowych w wątrobie, z drugiej zaś strony nasila biosyntezę tych kwasów, jak również ich napływ z tkanki tłuszczowej do wątroby, gdzie następnie ulegają estryfikacji do trójglicerydów /45,46,58,66,67,113/. Nagromadzone pod wpływem alkoholu w komórkach wątrobowych trójglicerydy tworzą krople tłuszczu, stanowiące najczęstszy morfologiczny objaw alkoholowego uszkodzenia wątroby /1,45,46,59,75,83/.

Poza alkoholem również liczne leki, w tym - jak wykazano w niniejszej pracy - disulfiram, mogą wywoływać zaburzenia przemiany lipidowej.

Tak więc disulfiram /Anticol/ podawany szczurom przewlekłe dożołądkowo prowadził do wzrostu stężenia trójglicerydów i cholesterolu w surowicy, a także do wzrostu poziomu trójglicerydów oraz spadku cholesterolu i wolnych kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej. Podobne zmiany wywoływał alkohol z tym, że w przeciwieństwie do disulfiramu zwiększał on stężenie cholesterolu i wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie, przy czym różnice te nie były statystycznie istotne.

Disulfiram stosowany łącznie z alkoholem prowadził do wzrostu stężenia trójglicerydów i cholesterolu w surowicy

oraz spadku poziomu cholesterolu w tkance wątrobowej, a więc do zmian podobnych do tych, które obserwowano w grupie zwierząt otrzymujących sam disulfiram z tym, że nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zachowaniu się badanych wskaźników przemiany tłuszczowej w obu tych grupach. Należy jednak zaznaczyć, że w grupie zwierząt otrzymujących sam disulfiram nie obserwowano w badaniu morfologicznym stłuszczenia hepatocytów, obserwowanego u szczurów otrzymujących sam alkohol oraz alkohol łącznie z disulfiramem.

Natomiast disulfiram implantowany podskórnym /Espéral/ nie wywoływał istotnych zaburzeń w zachowaniu się badanych wskaźników przemiany tłuszczowej, a stosowany łącznie z alkoholem prowadził do zbliżonych zmian w zachowaniu się trójglicerydów i cholesterolu w wątrobie jak sam alkohol.

Wzrost poziomu cholesterolu w surowicy zwierząt otrzymujących przewlekłe disulfiram, potwierdza wcześniejsze obserwacje Majora i Goyer'a /68/, którzy stwierdzili znaczną hypercholesterolemię u alkoholików otrzymujących disulfiram w porównaniu z nieleczonymi. Zdaniem tych autorów hypercholesterolemia może być wywołana przez dwusiarczek węgla, który jest końcowym metabolitem disulfiramu /24,95/, a który jak wiadomo z licznych badań /29,39,85,86,92,117,118/ prowadzi u przewlekłe eksponowanych do poważnych zaburzeń w przemianie tłuszczowej, objawiających się wzrostem stężenia trójglicerydów, cholesterolu i wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy.

Podisulfiramowe zaburzenia gospodarki lipidowej są najprawdopodobniej wyrazem oddziaływania tego leku na przemiany metaboliczne komórek wątrobowych i być może pozostają

w związku z hamowaniem przez disulfiram utleniania komórkowego, co wykazał m.in. Czyżyk w 1952 r. /14/.

Powyżej dyskutowane wyniki badań przemiany tłuszczowej przemawiają więc za tym, że disulfiram /Anticol/ wywołuje podobne zaburzenia w metabolizmie lipidów do tych, jakie obserwuje się po alkoholu. Stąd też należałoby sądzić, że przewlekłe stosowanie tego leku u alkoholików, wykazujących w większości przypadków zaburzenia przemiany tłuszczowej ze stłuszczeniem wątroby włącznie /45,46,75/, może przyczyniać się do podtrzymania tych zmian również u tych alkoholików, którzy pod wpływem leczenia disulfiramem zaprzestali konsumpcji alkoholu.

Kazuistyczne spostrzeżenia kliniczne dotyczące sporadycznych przypadków zapalenia wątroby u chorych leczonych disulfiramem /20,40,76,87,107/, jak również spostrzeżenia wskazujące na to, że disulfiram obostrza u alkoholików przebiegające subklinicznie uszkodzenie wątroby /46/, w konfrontacji z poprzednio przeprowadzonymi badaniami przez Kirchmayera i Cichockiego oraz wsp. /47/ w doświadczeniu ostrym oraz wynikami badań powyżej przedstawionych pozwalają przyjąć, że disulfiram wywiera słabe działanie hepatotoksyczne i może być traktowany jako "potencjalna hepatotoksyna". Uwzględniając bowiem rzadkość podisulfiramowego uszkodzenia wątroby należy przyjąć, że klinicznie jawne uszkodzenie tego narządu może disulfiram powodować u osób szczególnie predysponowanych, a więc wykazujących dyskretne zmiany w tym narządzie lub u takich osób, u których wpływ toksyczny disulfiramu nakłada się na działanie innych czynników ~~uszkodzających~~.

Wyniki przedstawionych badań pozwalają więc odrzucić poglądy /40/, wg których sporadycznie obserwowane "żółtaczkki" podisulfiramowe stanowiłyby wyraz działania disulfiramu jako "alergenu wątrobowego".

Na podkreślenie zasługuje fakt, że jak dotąd nie opisano uszkodzenia wątroby u ludzi, których leczono disulfiramem implantowanym podskórnym. Również powyżej dyskutowane wyniki przemawiają przeciwko działaniu toksycznemu na wątrobę tej postaci leku. Pozostaje to zapewne, jak już powyżej wspomniano, w związku z trudną rozpuszczalnością disulfiramu i indywidualnie zmiennym jego wchłanianiem z miejsca wszczepienia /6,43, 52,69,95,100,109,115/.

VI. W N I O S K I

=====

1. Disulfiram /Anticol/ przewlekłe podawany dożołądkowo szczurom wykazuje działanie hepatotoksyczne wyrażające się wzrostem surowiczej aktywności enzymów wskaźnikowych, fosfatazy alkalicznej, bilirubiny, spadkiem surowiczej aktywności ChE, jak również morfologicznymi cechami uszkodzenia komórek wątrobowych, ujawniającymi się przede wszystkim martwicą kwasochłonną, zwyrodnieniem wodniczkowym cytoplazmy, pojawianiem się cytosegrosomów oraz znacznym uszkodzeniem struktury mitochondriów.

2. Występujący przy przewlekłym podawaniu disulfiramowi spadek zawartości glikogenu, osłabienie odczynów histochemicznych na fosfatazę kwaśną i beta-glukuronidazę, przemieszczenie lizosomów do strefy okołojądrowej, spadek ilości szorstkiej i wzrost gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz pomnożenie peroksysomów w wątrobie mogą stanowić wyraz morfologiczny adaptacji do zadań metabolicznych związanych z przemianą tego leku.

3. Stopień nasilenia biochemicznych i morfologicznych zmian w wątrobie zależy od wielkości dawki disulfiramowi.

4. Disulfiram nasila uszkodzenie komórek wątrobowych wywołanych uprzednim podaniem D-galaktozaminy.

5. Łączne podawanie disulfiramowi z alkoholem nie nasila zmian biochemicznych i morfologicznych obserwowanych po samym disulfiramie lub samym alkoholu.

6. Disulfiram wszczepiony podskórnice /Espéral/ nie wywiera wpływu toksycznego na wątrobę.

7. Przewlekłe dożołądkowo podawany disulfiram wywołuje u szczurów zaburzenia gospodarki tłuszczowej podobne do powstających pod wpływem alkoholu, nie prowadzi jednak, w przeciwieństwie do alkoholu, do uchwytne go morfologicznie stłuszczenia hepatocytów.

8. Przeprowadzone badania potwierdzają w warunkach eksperymentalnych poprzednio przeprowadzone obserwacje kliniczne sugerujące hepatotoksyczne działanie disulfiramu u ludzi, zwłaszcza tych z uprzednio uszkodzoną wątrobą.

VII. S T R E S Z C Z E N I E

=====

Celem niniejszej pracy było wykazanie hepatotoksyczności przewlekle stosowanego disulfiram u zwierząt oraz zbadanie wpływu tego leku na wątrobę uszkodzoną D-galaktozaminą.

W pierwszej części pracy ocenę przewlekłego, 6-tygodniowego wpływu disulfiram na wątrobę przeprowadzono na 140 szczurach, podzielonych na 7 grup. Grupa I stanowiła kontrolę. Pozostałym szczurom podawano codziennie dożołądkowo disulfiram /Anticol/ w dawce 150 mg/kg/dobę /grupa II/ i 300 mg/kg/dobę /grupa III/, alkohol w dawce 1,0 g/kg/dobę /grupa IV/, alkohol łącznie z disulfiramem /grupa V/ w dawkach jak w grupach II i IV, a ponadto grupie VI i VII wszczepiono podskórnie disulfiram /Espéral/ w dawce 400 mg/kg, przy czym zwierzętom grupy VII dodatkowo podawano alkohol dożołądkowo w dawce 1,0 g/kg/dobę.

Stwierdzono, że disulfiram stosowany przewlekle dożołądkowo wpływa toksycznie na ogólny stan zwierząt, a podawany w dawce 150 mg/kg/dobę wywołuje wzrost surowiczej aktywności ALAT, AP i spadek ChE, zaś w dawce 300 mg/kg/dobę prowadzi do wzrostu surowiczej aktywności ALAT, AspAT, AP, spadku ChE i wzrostu stężenia bilirubiny. Surowicza aktywność ALAT i stężenie bilirubiny były znamienne wyższe u szczurów otrzymujących

disulfiram w dawce 300 mg/kg/dobę w porównaniu z wynikami tych oznaczeń u szczurów otrzymujących ten lek w dawce 150 mg/kg/dobę.

Przewlekłe stosowany alkohol wywoływał wzrost surowiczej aktywności AP i spadek ChE. Stosowany łącznie z disulfiramem powodował również statystycznie znamiennej wzrost aktywności ALAT i AP oraz spadek ChE w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną, zaś w porównaniu z grupą otrzymującą sam alkohol lub sam disulfiram różnice te nie były znamienne. Espéral nie powodował żadnych zmian w zakresie badanych enzymów wątrobowych i bilirubiny, a stosowany z alkoholem wywoływał jedynie znamiennej wzrost surowiczej aktywności AP, natomiast spadek aktywności ChE nie wykazywał cech znamienności statystycznej.

W badaniach histologicznych wątroby szczurów otrzymujących disulfiram w dawce 150 mg/kg/dobę stwierdzono grudowatość cytoplazmy, ubytek glikogenu, zaburzenie biegunowości hepatocytów z osłabieniem reakcji na markery lizosomalne. Podobne zmiany w wątrobie szczurów lecz o większym nasileniu wywoływał disulfiram w dawce 300 mg/kg/dobę, ponadto u tych zwierząt obserwowano pojawienie się zwyrodnienia wodniczkowego cytoplazmy, martwicę kwasochłonną hepatocytów, jak również duże lizosomy odpowiadające cytosegrosomom. W wątrobie szczurów otrzymujących alkohol poza grudowatością cytoplazmy i ut. glikogenu występowało stłuszczenie komórek w centrum zrazika oraz osłabienie odczynów na markery lizosomalne, zaś łącznie podanie disulfiramu z alkoholem powodowało zmiany w tym narządzie zbliżone do tych obserwowanych po samym disulfiramil. Espéral poza grudowatością cytoplazmy, ubytkiem glikogenu

w komórkach III strefy gronka i niewielkim osłabieniem odczynów na markery lizosomalne nie wywoływał innych zmian w wątrobie. W grupie zwierząt otrzymujących esperal łącznie z alkoholem stwierdzono zmiany podobne do opisanych po samym alkoholu.

Badanie ultrastruktury komórek wątrobowych szczurów, którym podawano przewlekle disulfiram ujawniły ubytek glikogenu w cytoplazmie, zmniejszenie szorstkiej i pomnożenie gładkiej siateczki śródplazmatycznej, nieregularne rozmieszczenie mitochondriów ze zmianami gęstości elektronowej macierzy i obecnością figur mielinowych w ich obrębie, a także pomnożenie peroksosomów i przemieszczenie powiększonych lizosomów do okolicy okołojądrowej. W hepatocytach szczurów otrzymujących alkohol obecne były liczne krople lipidowe, pomnożone i poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej gładkiej, zmniejszona ilość siateczki szorstkiej oraz mitochondria o zróżnicowanym kształcie. Disulfiram podany łącznie z alkoholem powodował zmiany w hepatocytach podobne do obserwowanych po samym disulfiramie z tym, że występowały tu ponadto krople lipidowe w cytoplazmie. Stwierdzono również, że przewlekle dożołądkowo stosowany disulfiram wywołuje zaburzenie metabolizmu tłuszczów. Tak więc disulfiram podany szczurom dawce 150 mg/kg/dobę powodował spadek stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i wzrost trójglicerydów w wątrobie oraz spadek trójglicerydów i wzrost cholesterolu w surowicy, a podany w wyższej dawce /300 mg/kg/dobę/ wywoływał ponadto spadek stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie. Alkohol prowadził do wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, trójglicerydów i cholesterolu w wątrobie oraz wzrostu trójglicerydów

i cholesterolu w surowicy, zaś stosowany łącznie i disulfiramem wywoływał w porównaniu z grupą kontrolną wzrost trójglicerydów i spadek cholesterolu w wątrobie oraz wzrost cholesterolu w surowicy. Disulfiram wszczepiony podskórnie /Espéral/ nie wywierał istotnego wpływu na przemianę tłuszczową, zaś stosowany z alkoholem powodował wzrost cholesterolu w surowicy oraz wzrost poziomu trójglicerydów i cholesterolu w wątrobie.

W drugiej części pracy oceniono wpływ disulfiramu na wątrobę uprzednio uszkodzoną D-galaktozaminą. Doświadczenie przeprowadzono na 80 szczurach podzielonych na 4 grupy. Grupę I, kontrolną, stanowiło 20 zwierząt, którym nie podawano disulfiramu ani też D-galaktozaminy. Zwierzęta grupy II otrzymywały przez 3 kolejne dni disulfiram /Anticol/ w dawce 600 mg/kg/dobę dożołądkowo. Szczurom grupy III i IV wywoływano uszkodzenie wątroby D-galaktozaminą, podając ją w 2 iniekcjach dootrzewnowych w dawce 375 mg/kg/dobę z tym, że grupie IV po 24 godzinach dodatkowo podano dożołądkowo przez 3 kolejne dni disulfiram w dawce 600 mg/kg/dobę.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że D-galaktozamina wywołuje znaczne uszkodzenie wątroby u szczurów, wyrażające się w badaniach biochemicznych wzrostem w surowicy i spadkiem w wątrobie aktywności ALAT i AspAT, wzrostem aktywności AP w surowicy i wątrobie, spadkiem aktywności ChE w surowicy i wątrobie oraz wzrostem poziomu bilirubiny w surowicy. Natomiast w badaniach morfologicznych tych zwierząt stwierdzono rozsianą martwicę kwasochłonną hepatocytów z naciekami zapalnymi w przestrzeniach wrotnych i ich pobliżu, ubytek glikogenu i zaburzenie biegunowości hepatocytów

z pojawianiem się cytosegrosomów.

Podanie disulfiramu zwierzętom z uprzednio uszkodzoną wątrobą D-galaktozaminą powodowało dalszy znamieny wzrost aktywności ALAT oraz poziomu bilirubiny w surowicy, a także pojawienie się obszarów masywnej martwicy komórek wątrobowych z wylewami krwawymi w zrazikach i u blisko połowy zwierząt stłuszczenie wątroby. Zmiany te nakładały się na zmiany morfologiczne tego narządu takie same jak obserwowane u szczurów po podaniu samej D-galaktozaminy.

Przeprowadzone badania biochemiczne i morfologiczne wykazały, że w przeciwieństwie do disulfiramu wszczepionego podskórnie /Espéral/, disulfiram stosowany przewlekłe dożołądkowo /Anticol/ ujawnia działanie hepatotoksyczne. Hepatotoksyczność disulfiramu wykazuje przy tym wyraźną zależność od wielkości dawki dobowej. Wykazano również, że disulfiram stosowany łącznie z alkoholem nie nasila w uchwytny sposób zmian w wątrobie obserwowanych po samym disulfiramilub samym alkoholu. Disulfiram podany zwierzętom z uprzednio uszkodzoną wątrobą D-galaktozaminą obostrza zmiany wsteczne w hepatocytach i nasila zmiany biochemiczne, stanowiące wyraz uszkodzenia miąższu wątrobowego.

Stwierdzono również, że disulfiram wywołuje zaburzenia w gospodarce lipidowej, zbliżone do tych obserwowanych po alkoholu, nie prowadzi jednak w przeciwieństwie do alkoholu do uchwytnej morfologicznej stłuszczenia komórek wątrobowych.

Przedstawione powyżej wyniki badań potwierdzają na drodze eksperymentalnej zakładane na podstawie niektórych obserwacji klinicznych hepatotoksyczne działanie disulfiramu u ludzi, w szczególności tych z już uprzednio uszkodzoną wą-

P I Ś M I E N N I C T W O

=====

1. Baraona E., Leo M.A., Borowsky S.A., Lieber C.S.:
Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the
liver. *Science*, 1975, 190, 794-795.
2. Bergmayer H.V.: *Methoden der ensymatischen Analyze*.
Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
3. Bilikiewicz T.: Ulepszony sposób leczenia "antabusem"
alkoholizmu nałogowego. *Pol.Tyg.Lek.*, 1951, 7, 219-223.
4. Bode J.Ch.: Arzneimittelschäden der Leber. *Med.Welt.*,
1978, 29, 559-566.
5. Borchert P., Wattenberg L.W.: Inhibition of macromolecular
binding of benzo/ α /pyrene and inhibition of neoplasia by
disulfiram in the mouse forestomach. *J.Nat.Cancer Inst.*,
1976, 57, 173-179.
6. Boss D., Sauter A., Cornu F.: Abstinenzverhalten und
Disulfiram-Plasmakonzentration bei Alkoholikern nach
Espéral-Implantation. *Schweiz.med.Wschr.*, 1976, 106,
1074-1077.
7. Brylińska J.: Żywienie zwierząt laboratoryjnych, w:
Zwierzęta laboratoryjne - hodowla i użytkowanie. red.
H.Krzanowska, J.Preibisch i P.Korda, PZWL, Warszawa, 1974.
8. Burck H.: *Technika histologiczna*. PZWL, Warszawa, 1975.
9. Casier H., Polet H.: Influence du disulfiram /Antabus/
sur le métabolisme de l'alcool éthylique marque chez la
souris. *Arch.int.Pharmacodyn.*, 1958, 63, 439-496.
10. Cederbaum A.I., Lieber C.S., Rubin E.: The effect of
acetaldehyde on mitochondrial function. *Arch.Biochem*.
Biophys., 1974, 161, 26-39.

11. Child G.P., Crump M The toxicity of tetraethylthiuram disulphide /Antabuse/ to mouse, rat, rabbit and dog. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 1952, 8, 305-314.
12. Chudzikiewicz T.: Antabus i jego wpływ na krążenie podczas odwykowego leczenia przewlekłego alkoholizmu. *Pol.Tyg.Lek.*, 1953, 8, 783-786.
13. Cichocki T.: Lizosomy i peroksosomy. w: *Podstawy cytofizjologii.* red. J.Kawiak, J.Mirecka i J.Warchoł. PWN, Warszawa, 1978.
14. Czyżyk A.: Farmakologiczne własności dwusiarczku czteroetylotiuramu /Antabuse'a/ i niektórych jego pochodnych. *Rozprawy Wydz.Lek. PAU, Kraków*, 1952, 12, 261-298.
15. Dalvi R.R. , Hunter A.L., Neal R.A.: Toxicological implications of the mixed-function oxidase catalysed metabolism of carbon disulfide. *Chem.Biol.Interaction*, 1975, 10, 347.
16. De Matteis F.: Covalent binding of sulfur to microsomes and loss of cytochrome P-450 during the oxidative desulfuration of several chemicals. *Molec.Pharmac.*, 1974, 10, 849.
17. De Saint Blanquat G., Derache R.: Mecanisme d'action des substances anti alcool dependantes /disulfirame/. *J.Pharmacol.*, 1976, 7, 393-408.
18. De Saint Blanquat G., Vidailiac G., Lindenbaum A., Derache R.: Absorption digestive, fixation tissulaire et excretion du disulfirame administre oralement chez le rat. *Arch. int.Pharmacodyn.*, 1976, 223, 339-350.
19. Djuric D., Postic Grujin A., Graovac Leposavic L., Delic V. Disulfiram as an indicator of human susceptibility to carbon disulfide. Excretion of diethyldithiocarbamate sodium in the urine of workers exposed to CS₂ after oral administration of disulfiram. *Arch.Environm.Hlth.*, 1973, 26, 287-289.
20. Eisen H.J., Ginsberg A.L.: Disulfiram hepatotoxicity. *Ann.Intern.Med.*, 1975, 83, 673-675.

21. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem.Pharmacol.*, 1961, 7, 88.
22. Ekvärn S., Jönsson M., Lindquist N.G., Holmberg B., Kronevi T.: Disulfiram-induced myocardial and skeletal-muscle degeneration in rats. *Lancet*, 1977, 8041, 770-771.
23. Fiala E.S., Bobotas G., Kulakis C. et al.: Effects of disulfiram and related compounds on the metabolism in vivo of the colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine. *Biochem. Pharmacol.*, 1977, 26, 1763-1768.
24. Fischer R., Brantner H.: Über den Metabolismus des Disulfiram. *Arzneim.-Forsch. /Drug Res./*, 1967, 17, 1461-1464.
25. Folch J., Lees M., Stanley S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, 1957, 226, 497-509.
26. Freundt K.J., Kutter P., Dreher W.: Specificity and sensitivity of the inhibition of drug metabolism following inhalation of carbon disulfide-air mixtures. *Arzneim.-Forsch. /Drug Res./*, 1976, 26, 793-799.
27. Fuller R.K., Roth H.P.: Disulfiram for the treatment of alcoholism, a evaluation in 128 men. *Ann.Intern.Med.*, 1979, 90, 901-904.
28. Gershbein L.L.: of disulfiram and diethyldithiocarbamate on liver regeneration and diaphragm carbohydrate metabolism of the rat. *Quart.J.Stud.Alcohol.*, 1966, 27, 1-6.
29. Glińska D., Kośmider K., Badania nad wpływem dwusiarczku węgla na metabolizm i zmiany narządowe zwierząt doświadczalnych. III. Zmiany morfologiczne i zachowanie się fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz lipidów w wątrobie szczurów przewlekle zatrutowanych dootrzewnowo podawanym dwusiarczkiem węgla. *Patol.Pol.*, 1969, 20, 397-405.
30. Hryniewicz L., Hołyst J.: Niezwykłe powikłania reakcji antykolowo-alkoholowej. *Pol.Tyg.Lek.*, 1963, 18, 93.

31. Hrynkiewicz L., Szyndlik H.: Objawy uboczne i powikłania w leczeniu alkoholizmu disulfiramem /antikolem/. *Pol.Tyg. Lek.*, 1963, 32, 1190-1193.
32. Iber F.L.: Drug metabolism in heavy consumers of ethyl alcohol. *Clin.Pharm.Therap.*, 1977, 22, 735-742.
33. Iber F.L., Chowdhury B.: The persistence of the alcohol-disulfiram reaction after discontinuation of drug in patients with and without liver disease. *Alcoholism: Clin. Exp.Res.*, 1977, 4, 365-370.
34. Ishii Y., Yoshikawa A.: Effect of disulfiram on body temperature in rats. *Jap.J.Pharmacol.*, 1974, 24, suppl., 143.
35. Jagiełło W., Skulimowski A.: Pięć lat doświadczeń w leczeniu alkoholików wszczepianiem Esperalu. *Alkohologia*, 1977, 7, 101-108.
36. Joly J.-G., Yelle L.: Effect of chronic ethanol administration on mechanisms of hepatotoxicity of foreign compounds. *Clin.Res.*, 1977, 25, 688A.
37. Kalant H., Khanna J.M., Lin G.Y., Chung S.: Ethanol - a direct inducer of drug metabolism. *Biochem.Pharmacol.*, 1976, 25, 337-342.
38. Kalow W., Inaba T.: Genetic factors in hepatic drug oxidations. w: *Progress in liver diseases*, vol.V, red. H.Popper i F.Schaffner, Grune and Stratton, New York, 1976.
39. Kane F.J.: Carbon disulfide intoxication from overdosage of disulfiram. *Am.J.Psychiatry*, 1970, 127, 690-694.
40. Keefe E.B., Smith F.W.: Disulfiram hypersensitivity hepatitis. *JAMA*, 1974, 230, 435-436.
41. Keppler D., Lesch R., Reutter W., Decker K.: Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp.Mol.Pathol.*, 1968, 9, 279-290.
42. Keppler D., Decker K.: Studies on the mechanism of galactosamine-hepatitis: Accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur. J.Biochem.*, 1969, 10, 219-225.

43. Kingstone E., Kline S.A.: Disulfiram implants in the treatment of alcoholism: some mechanisms of action. *Int.Pharmacopsychiat.*, 1975, 10, 183-191.
44. Kirchmayer S.: Hepatopatie polekowe. *Pol.Arch.Med.Wewn.*, 1974, 51, 519-530.
45. Kirchmayer S.: Alkoholowe uszkodzenie wątroby. *Pol.Arch. Med.Wewn.*, 1977, 57, 51-62.
46. Kirchmayer S., Bogdał J., Caban M., Cichecka K., Drożdż H., Mika M., Szczudrawa J., Tarnawski A.: Stan anatomiczny i czynnościowy wątroby nałogowych alkoholików. *Pol.Arch. Med.Wewn.*, 1977, 57, 97-106.
47. Kirchmayer S., Cichocki T., Bogdał J., Mach T., Pawlicki R. Stachura J., Szczudrawa J., Tarnawski A.: Experimental studies on hepatotoxicity of disulfiram. *Materia Med.Polona* 1979, 38, 40-46.
48. Kissin B.: Medical management of the alcoholic patients. w: *The biology of alcoholism*, vol.V, red. B.Kissin i H. Begleiter, Plenum Press, New York, 1977.
49. Kitson T.M.: The effect of disulfiram on the aldehyde dehydrogenase of sheep liver. *Biochem.J.*, 1975, 151, 407-412.
50. Kitson T.M.: The effect of some analogues of disulfiram on the aldehyde dehydrogenases of sheep liver. *Biochem.J.*, 1976, 155, 445-448.
51. Kitson T.M.: The disulfiram ethanol reaction: a review. *J.Stud.Alcohol.*, 1977, 38, 96-113.
52. Kitson T.M.: On the probability of implanted disulfiram's causing a reaction to ethanol. *J.Stud.Alcohol.*, 1978, 39, 183-186.
53. Koćma E.: Ocena farmakokinetyczna niektórych związków z grupy inhibitorów beta-hydroksylazy dopaminy. *Praca doktorska*, AM, Kraków, 1976.
54. Koivusalo M.: Effect of disulfiram /tetraethylthiuram disulphide/ on the metabolism of methanol in rat liver homogenates. *Acta physiol.scand.*, 1959, 45, 271-277.

55. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice PZWL, Warszawa, 1969.
56. Kulisiewicz T.: Nowoczesne ambulatoryjne leczenie nałogowych alkoholików. Pol.Tyg.Lek., 1958, 4, 141-147.
57. Lamboeuf Y., De Saint Blanquat G., Derache R.: Secretion and irrigation of gastric mucosa during disulfiram effect. *Arzneim.-Forsch. /Drug Res./*, 1976, 26, 1344-1349.
58. Leevy C.M., Tanribilir A.K., Smith F.: Biochemistry of gastrointestinal and liver diseases in alcoholism. w: *The biology of alcoholism*, vol.1. red. B.Kissin i H.Begleiter, Plenum Press, New York, 1971.
59. Leibach W.K.: Epidemiology of alcoholic liver disease. w: *Progress in liver diseases*, red. H.Popper i F.Schaffner, Gruna and Stratton Inc., New York, 1976.
60. Lesch R., Reutter W., Keppler D., Decker K.: Liver regeneration after acute galactosamine hepatitis: Autoradiographic and biochemical studies in rats. *Exp.Mol.Pathol.*, 1970, 12, 58-69.
61. Lewkowski W.: Toksyczność disulfiramu. *Alkohologia Łódzka*, 1965, 3, 97-100.
62. Lewkowski W.: Przeciwwskazania do użycia antikolu w leczeniu alkoholików. *Pol.Tyg.Lek.*, 1965, 6, 222-223.
63. Lewkowski W.: Przeciwwskazania do stosowania disulfiramu. *Alkohologia Łódzka*, 1967, 2, 55.
64. Lewkowski W., Jagiełło W.: Przyczynę do oceny wpływu antikolu na stan zdrowia alkoholików na podstawie badań laboratoryjnych. *Alkohologia Łódzka*, 1967, 3, 77-82.
65. Lewkowski W.: Disulfiram a objawy uboczne. *Alkohologia Łódzka*, 1971, 5, 49-55.
66. Lieber C.S., Rubin E., DeCarli L.M.: Effect of ethanol on lipid, uric acid, intermediary, and drug metabolism, including the pathogenesis of the alcoholic fatty liver. w: *The biology of alcoholism*, red. B.Kissin i H.Begleiter, vol.1, Plenum Press, New York, 1971.

67. Lieber C.S., Baraona E., Borowsky S.A., Leo M.: Effect of ethanol on lipoprotein and protein export from the liver and its relationship to progressive liver injury. w: Membrane alterations as basis of liver injury, red. H. Popper, L.Bianchi i W.Reutter, MTP Press Ltd., London, 1977
68. Major L.F., Goyer P.F.: Effect of disulfiram and pyridoxine on serum cholesterol. *Ann.Intern.Med.*, 1978, 88, 53-56.
69. Malcolm M.T., Madden J.S.: The use of disulfiram implantation in alcoholism. *Br.J.Psychiatry*, 1973, 123, 41-55.
70. Malcolm M.T.: Disulfiram blood levels. *Letter.Brit.Med.J.*, 1977, 2, 457.
71. Mannering G.J.: Biochemistry of drug biotransformation. w: *Drugs and the liver*, red. W.Gerok i K.Sickinger, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1975.
72. Marchner H., Tottmar O.: A comparative study on the effect of disulfiram, cyanamide and l-aminocyclopropanol on the acetaldehyde metabolism in rats. *Acta pharmacol. et toxicol* 1978, 43, 219-232.
73. Mc Lean A.E.M.: *Drugs, diet and liver injury*. w: *Drugs and the liver*, red. W.Gerok i K.Sickinger, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1975.
74. Medline A., Schaffner F., Popper H.: Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis. *Exp.Mol.Pathol.*, 1970, 12, 201-211.
75. Mörl M., Kuntzel W.: Organische Komplikationen der Alkohol-Krankheit. *Fortsch.Med.*, 1978, 18, 947-951.
76. Morris S.J., Kanner R., Chiprut R.O., Schiff E.R.: Disulfiram hepatitis. *Gastroenterology*, 1978, 75, 100-102.
77. Okniński Ambulatoryjne leczenie przewlekłego alkoholizmu środkami farmakologicznymi. *Pol.Tyg.Lek.*, 1959, 14, 1068-1070.
78. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metoda doświadczalnościwa*. PWN, Warszawa, 1962.

79. Olesen O.V.: Disulfiramum /Antabuse/ as inhibitor of phenytoin metabolism. *Acta pharmacol et toxicol.*, 1966, 24, 317-322
80. Operacz H.: Uboczne działanie antikolu. *Wiad.Lek.*, 1967, 20, 2091-2094.
81. O'Reilly R.A.: Interaction of sodium warfarin and disulfiram /Antabus/ in man. *Ann.Intern.Med.*, 1973, 78, 73-76.
82. Pearse A.G.E.: *Histochemistry theoretical and applied. vol. 2.* Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1972.
83. Porta E.A., Hartroft W.S., de la Iglesia F.A.: Hepatic changes associated with chronic alcoholism in rats. *Lab.Invest.*, 1965, 14, 1437-1455.
84. Przegaliński E.: O katalepsji po disulfiramie. w: *Farmakologia amin katecholowych oraz leków działających na układ nerwowy*, PZWL, Warszawa, 1971, 172.
85. Rainey J.M.: Disulfiram toxicity and carbon disulfide poisoning. *Am.J.Psychiatry*, 1977, 134, 371-378.
86. Rainey J.M., Neal R.A.: Disulfiram, carbon disulphide, and atherosclerosis. *Lancet*, 1975, 7901, 284-285.
87. Ranek L., Andreasen P.B.: Disulfiram hepatotoxicity. *Brit. Med.J.*, 1977, 2, 94-96.
88. Rappaport A.M.: Hepatic circulation and structure. *Med. Prisma, Boehringer Ingelheim*, 1978, 1, 4-28.
89. Reutter W., Lesch R., Keppler D., Decker K.: Galactosamin-Hepatitis. *Naturwiss.*, 1968, 55, 497.
90. Rothschild M.A., Oratz M., Schreiber S.S.: Acetaldehyde, disulfiram, and albumin synthesis. *Gastroenterology*, 1977, 73, 1244.
91. Rubin E., Hutterer F., Lieber C.S.: Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolising enzymes. *Science*, 1968, 159, 1469-1470.
92. Rudkowska A., Micztał S., Pawłowicz J., Paradowski B., Ujma B., Klinowicz H.: *Wybrane parametry gospodarki*

- tłuszczowej u osób narażonych zawodowo na działanie CS₂. Pol.Tyg.Lek., 1978, 33, 1641-1644.
93. Rusiecki W., Kubikowski P.: Toksykologia współczesna. PZWL, Warszawa, 1977.
94. Sauter A.M., Boss D., von Warburg J.-P.: Reevaluation of the disulfiram-alcohol reaction in man. J.Stud.Alcohol., 1977, 38, 1680-1695.
95. Sauter A.M., Wiegrebe W., von Warburg J.-P.: Determination of disulfiram and its metabolites in human blood. Arzneim.-Forsch. /Drug Res./, 1976, 26, 173-177.
96. Schedifka R.: Weitere Erkenntnisse über die Disulfiramwirkung. Zschr. ärztl.Fortbild., 1970, 64, 106-110.
97. Schmaehl D., Krueger F.W., Habs M., Diehl B.: Influence of disulfiram on the organotropy of the carcinogenic effect of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine in rats. Z.Krebs.Forsch., 1976, 85, 271-276.
98. Schmidt E., Schmidt F.W.: Sex differences of plasma cholinesterase in the rat. Enzyme, 1978, 23, 52-55.
99. Schurr A., Ho B.T., Schoolar J.C.: The effects of disulfiram on rat liver mitochondrial monoamine oxidase. Life Sci., 1978, 22, 1979-84.
100. Sobczyk P.: Współczesne aspekty leczenia choroby alkoholowej. Pol.Tyg.Lek., 1979, 34, 187-190.
101. Sorrell M.F., Tuma D.J., Barak A.J.: Evidence that acetaldehyde irreversibly impairs glycoprotein metabolism in liver slices. Gastroenterology, 1978, 73, 1138-1141.
102. Strubelt O., Obermeier F., Siegers C.P.: The influence of ethanol pretreatment on the effect of nine hepatotoxic agents. Acta pharmacol. et toxicol., 1978, 43, 211-218.
103. Szczeklik E.: Enzymologia kliniczna. PZWL, Warszawa, 1974.
104. Tottmar O., Marchner H.: Disulfiram as a tool in the studies on the metabolism of acetaldehyde in rats. Acta pharmacol. et toxicol., 1976, 38, 366-375.

105. Truitt E.B., Walsh M.J.: The role of acetaldehyde in the action of ethanol. w: The biology of alcoholism, vol.1, red. B.Kissin i H.Begleiter, Plenum Press, New York, 1971.
106. Trump B.F., Kim K.M., Jones R.T., Valigorsky J.M.: Pathology of organelles in the human hepatic parenchymal cell. w: Progress in liver diseases, red. H.Popper i F.Schaffner, Grune and Stratton Inc., New York, 1976.
107. Vazquez J.J., Pardo-Mindan J.: Liver cell injury /bodies similar to Lafora's/ in alcoholics treated with disulfiram /Antabuse/. Histopathology, 1979, 3, 377-384.
108. Vesell E.S., Passananti G.T., Glenwright P.A.: Anomalous results of studies on drug interaction in man. III. Disulfiram and antipyrine. Pharmacology, 1975, 13, 481-491.
109. Wacławik P.: W sprawie leczenia Esperalem. Terapia i Leki, 1979, 29, 75-77.
110. Watanabe A., Akamatsu K., Takesue A., Taketa K.: Dysregulation of protein synthesis in injured liver. Enzyme, 1978, 23, 320-327.
111. Wattenberg L.W.: Inhibition of dimethylhydrazine induced neoplasia of the large intestine by disulfiram. J.Nat. Cancer Inst., 1975, 54, 1005-1006.
112. Webb P.K., Gibbs S.C.: Disulfiram hypersensitivity and rubber contact dermatitis. JAMA, 1979, 241, 2061.
113. Weir D.G.: The pathophysiology of alcohol and acetaldehyde metabolism in the liver. Eur.J.Clin.Invest., 1978, 8, 263-265.
114. Williams R.T.: Chemistry of detoxication. w: Drugs and the liver, red. W.Gerok i K.Sickinger, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 1975.
115. Wilson A.: Disulfiram implantation in alcoholism treatment. A review. J.Stud.Alcohol., 1975, 36, 555-565.
116. Wilson A., Davidson W.J., Blanchard R., White J.: Disulfiram implantation. A placebo-controlled trial with two-year follow-up. J.Stud.Alcohol., 1978, 39, 809-819.

117. Woyke M Zmiany morfologiczne w komórce wątrobowej szczurów przewlekłe zatrutowanych dwusiarczkiem węgla. Patol.Pol., 1969, 20, 103-118.
118. Wrońska-Nofer T.: Niektóre zaburzenia metabolizmu cholesterolu i ich udział w rozwoju doświadczalnej miażdżycy u szczurów narażonych na dwusiarczek węgla. Med.Pracy, 1979, 30, 121-134.
119. Zajączkowski H.: Leczenie alkoholizmu przewlekłego środkiem uczulającym. Pol.Tyg.Lek., 1949, 16, 504-505.
120. Zawistowski S.: Technika histologiczna - histologia oraz podstawy histopatologii. PZWL, Warszawa, 1975.
121. Zemaitis M.A., Greene F.E.: Impairment of hepatic microsomal and plasma esterases of the rat by disulfiram and diethyldithiocarbamate. Biochem.Pharmacol., 1976, 25, 453-459.
122. Zemaitis M.S., Greene F.E.: Impairment of hepatic microsomal drug metabolism in the rat during daily disulfiram administration. Biochem.Pharmacol., 1976, 25, 1355-1360.
123. Zemaitis M.S., Greene F.E.: In vivo and in vitro effects of thiuram disulfides and dithiocarbamates on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. Toxicol.Appl. Pharmacol., 1979, 48, 343-350.
124. Ziegler E., Meyer H.J.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Antabuswirkung. Arch.int.Pharmacodyn., 1959, 73, 34-47.

Tabela 1.

Zachowanie się ciężaru ciała badanych zwierząt.

Badana grupa	Ciężar ciała szczurów / \bar{x} ± SEM /		% przyrostu / +/ lub spadku / -/ ciężaru ciała
	Na początku doświadczenia / g /	Po 6 tygodniach / g /	
I - Kontrola	241 ± 9	264 ± 12	+ 9,5 %
II - Anticol /150 mg/kg/	236 ± 11	192 ± 6	- 18,6 %
III - Anticol /300 mg/kg/	247 ± 6	186 ± 9	- 24,7 %
IV - Esperal	236 ± 7	210 ± 10	- 11,0 %
V - Alkohol	243 ± 11	226 ± 8	- 7,0 %
VI - Anticol + alkohol	241 ± 9	201 ± 12	- 16,6 %
VII - Esperal + alkohol	238 ± 6	217 ± 10	- 8,8 %

Tabela 2.

Zachowanie się aktywności aminotransferazy alaninowej /ALAT/ i asparaginianowej /AsPAT/ oraz fosfatazy alkalicznej /AP/ w surowicy szczurów. N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej, p - poziom istotności.

Badana grupa	ALAT /mU/ml/			AsPAT /mU/ml/			AP /mU/ml/		
	N	\bar{x} ± SEM	p	N	\bar{x} ± SEM	p	N	\bar{x} ± SEM	p
I - Kontrola	15	42,7 ± 1,6		15	63,1 ± 2,5		14	213,0 ± 10,0	
II - Antikol /150 mg/kg/	13	58,0 ± 3,1	<0,05	12	72,2 ± 3,2	>0,05	12	304,3 ± 15,5	<0,05
III - Antikol /300 mg/kg/	10	69,8 ± 2,9	<0,05	10	77,6 ± 4,2	<0,05	10	316,9 ± 19,6	<0,05
IV - Esperal	12	46,3 ± 4,8	>0,05	12	68,9 ± 2,9	>0,05	12	248,2 ± 16,6	>0,05
V - Alkohol	13	47,9 ± 3,2	>0,05	12	67,6 ± 4,9	>0,05	13	297,1 ± 10,3	<0,05
VI - Antikol + alkohol	11	53,8 ± 3,1	<0,05	10	71,7 ± 3,7	>0,05	10	295,6 ± 20,1	<0,05
VII - Esperal + alkohol	11	46,7 ± 2,0	>0,05	11	70,6 ± 3,1	>0,05	11	267,3 ± 14,1	<0,05

Porównanie ALAT pomiędzy grupami: II i III p < 0,05; III i IV p < 0,05; III i V p < 0,05; III i VI p < 0,05; III i VII p < 0,05.

Porównanie ALAT, AsPAT i AP pomiędzy pozostałymi grupami p > 0,05.

Tabela 3.

Zachowanie się aktywności cholinesterazy /ChE/ oraz stężenia bilirubiny całkowitej w surowicy szczurów. N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej, p - poziom istotności.

Badana grupa	ChE /mU/mL			Bilirubina /mg%		
	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p
I - Kontrola	15	460,0 \pm 28,8		14	0,30 \pm 0,07	
II - Antikol /150 mg/kg/	12	373,3 \pm 25,0	<0,05	12	0,54 \pm 0,09	>0,05
III - Antikol /300 mg/kg/	10	347,5 \pm 32,2	<0,05	10	0,76 \pm 0,06	<0,05
IV - Esperal	12	446,0 \pm 30,5	>0,05	12	0,46 \pm 0,16	>0,05
V - Alkohol	10	357,5 \pm 23,5	<0,05	12	0,51 \pm 0,13	>0,05
VI - Antikol + alkohol	11	402,5 \pm 25,9	<0,05	10	0,69 \pm 0,16	>0,05
VII - Esperal + alkohol	13	412,1 \pm 26,5	>0,05	11	0,62 \pm 0,10	>0,05

Porównanie ChE pomiędzy grupami III i IV p < 0,05; IV i V p < 0,05.

Porównanie bilirubiny pomiędzy grupami II i III p < 0,05.

Porównanie ChE i bilirubiny pomiędzy pozostałymi grupami p > 0,05.

Tabela 4^o

Zachowanie się stężenia wolnych kwasów tłuszczowych /FFA/ w homogenatach tkanki wątrobowej oraz w surowicy szczurów. N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej, p - poziom istotności.

Badana grupa	Tkanka wątrobowa / $\mu\text{M}/100 \text{ mg/}$		Surowica / $\mu\text{M}/1000 \text{ ml/}$		
	N	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	N	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p
I - Kontrola	15	$2,30 \pm 0,14$	13	$112,8 \pm 12,1$	
II - Antikol /150 mg/kg/	12	$1,99 \pm 0,10$	12	$138,6 \pm 19,5$	$> 0,05$
III - Antikol /300 mg/kg/	10	$1,69 \pm 0,15$	10	$141,9 \pm 26,1$	$> 0,05$
IV - Esperal	12	$2,28 \pm 0,11$	11	$124,8 \pm 21,3$	$> 0,05$
V - Alkohol	13	$2,69 \pm 0,08$	12	$136,9 \pm 24,7$	$> 0,05$
VI - Antikol + alkohol	10	$2,57 \pm 0,09$	10	$104,8 \pm 23,4$	$> 0,05$
VII - Esperal + alkohol	11	$2,45 \pm 0,10$	11	$132,9 \pm 20,3$	$> 0,05$

Porównanie FFA tkance wątrobowej pomiędzy grupami: V i II $p < 0,05$;

V i III $p < 0,05$; V i IV $p < 0,05$; VI i II $p < 0,05$; VI i III $p < 0,05$;

VII i III $p < 0,05$; VII i II $p < 0,05$.

Porównanie FFA pomiędzy pozostałymi grupami w tkance wątrobowej i w surowicy $p > 0,05$.

Tabela 5.

Zachowanie się stężenia trójglicerydów /TG/ w homogenatach tkanek wątrobowej oraz w surowicy szczerów. N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej, p - poziom istotności.

Badana grupa	Tkaneczka wątrobowa / $\mu\text{M}/100 \text{ mg/}$		Surowica / $\mu\text{M}/1000 \text{ mL/}$	
	N	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	N	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
I - Kontrola	14	0,61 \pm 0,03	14	1709,1 \pm 80,6
II - Antikol /150 mg/kg/	12	0,72 \pm 0,05	12	2213,3 \pm 138,1
III - Antikol /300 mg/kg/	10	0,81 \pm 0,08	10	2436,1 \pm 190,9
IV - Esperal	10	0,65 \pm 0,10	9	1975,7 \pm 170,7
V - Alkohol	13	0,69 \pm 0,07	12	2328,5 \pm 169,2
VI - Antikol + alkohol	10	0,72 \pm 0,13	10	2651,5 \pm 183,8
VII - Esperal + alkohol	11	0,73 \pm 0,09	10	2115,7 \pm 193,0

Porównanie TG w tkance wątrobowej pomiędzy poszczególnymi grupami $p > 0,05$.

Porównanie TG w surowicy pomiędzy grupami IV i VI $p < 0,05$ oraz pozostałymi $p > 0,05$.

Tabela 6.

Zachowanie się stężenia cholesterolu /CH/ w homogenatach tkanki wątrobowej oraz w surowicy szczurów. N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej, p - poziom istotności.

Badana grupa	Tkaneczka wątrobowa / mg/g /		Surowica / mg% /		P
	N	$\bar{x} \pm$ SEM	N	$\bar{x} \pm$ SEM	
I - Kontrola	14	3,60 \pm 0,18	13	44,11 \pm 2,09	
II - Antikol /150 mg/kg/	12	3,51 \pm 0,37	12	67,83 \pm 2,36	< 0,02
III - Antikol /300 mg/kg/	10	2,83 \pm 0,32	10	62,73 \pm 2,25	< 0,02
IV - Esperal	11	3,25 \pm 0,17	9	50,31 \pm 2,42	0,05
V - Alkohol	13	4,21 \pm 0,24	12	56,27 \pm 2,15	< 0,025
VI - Antikol + alkohol	10	2,87 \pm 0,28	10	59,01 \pm 2,30	< 0,025
VII - Esperal + alkohol	11	4,42 \pm 0,27	11	55,47 \pm 2,00	< 0,05

Porównanie CH w tkance wątrobowej pomiędzy grupami: II i VII p < 0,05;

III i V p < 0,05; III i VII p < 0,05; VI i VII p 0,05.

Porównanie CH w tkance wątrobowej i surowicy pomiędzy pozostałymi grupami p 0,05.

Tabela 7.

Zachowanie się aktywności ALAT w surowicy oraz w homogenatach tkanki wątrobowej szczurów.
 N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej,
 p - poziom istotności.

Badana grupa	Surowica / mU/ml /			Tkanka wątrobowa / mU/mg /		
	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p
I - Kontrola	17	35,2 \pm 1,5		14	75,0 \pm 7,1	
II - Antikol / 600 mg/kg/	12	39,6 \pm 3,5	> 0,05	10	83,3 \pm 6,2	> 0,05
III - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg	14	659,1 \pm 66,8	< 0,001	12	53,6 \pm 3,5	< 0,05
IV - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg + Antikol / 600 mg/kg/	12	782,6 \pm 38,4	< 0,001	13	56,2 \pm 4,3	< 0,05

Porównanie ALAT w surowicy pomiędzy grupami: II i III p < 0,001;

II i IV p < 0,001; III i IV p < 0,05.

Porównanie ALAT w tkance wątrobowej pomiędzy grupami: II i III p < 0,05;

II i IV p < 0,05; III i IV p > 0,05.

Tabela 8.

Zachowanie się aktywności AspAT w surowicy oraz w homogenatach tkanki wątrobowej szozurów.
 N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej,
 p - poziom istotności.

Badana grupa	Surowica / mU/ml /			Tkanka wątrobowa / mU/mg /		
	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p
I - Kontrola	12	54,6 \pm 2,7		12	270,2 \pm 14,0	
II - Antikol / 600 mg/kg/	10	67,2 \pm 3,5	> 0,05	10	225,9 \pm 13,8	> 0,05
III - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg	14	561,7 \pm 50,2	< 0,001	12	216,6 \pm 10,3	< 0,05
IV - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg + Antikol / 600 mg/kg/	10	608,2 \pm 49,3	< 0,001	11	211,4 \pm 11,4	< 0,05

Porównanie AspAT w surowicy pomiędzy grupami: II i III p < 0,001;

II i IV p < 0,001; III i IV p > 0,05.

Porównanie AspAT w tkance wątrobowej pomiędzy grupami: II i III p > 0,05;

II i IV p > 0,05; III i IV p > 0,05.

Tabela 9.

Zachowanie się aktywności AP w surowicy oraz w homogenatach tkanki wątrobowej szczurów.

N - liczebność badanej grupy, \bar{X} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej,

p - poziom istotności.

Badana grupa	Surowica / mU/ml /			Tkaneczka wątrobowa / mU/mg/		
	N	$\bar{X} \pm SEM$	p	N	$\bar{X} \pm SEM$	p
I - Kontrola	16	195,4 \pm 10,8		14	0,85 \pm 0,08	
II - Antikol / 600 mg/kg/	12	276,9 \pm 16,9	< 0,05	11	0,96 \pm 0,20	> 0,05
III - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg	15	474,0 \pm 37,1	< 0,001	12	2,89 \pm 0,70	< 0,01
IV - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg + Antikol / 600 mg/kg/	12	495,8 \pm 64,7	< 0,001	12	3,19 \pm 0,40	< 0,01

Porównanie AP w surowicy pomiędzy grupami: II i III p < 0,01; II i IV p < 0,01;

III i IV p > 0,05.

Porównanie AP w tkance wątrobowej pomiędzy grupami: II i III p < 0,05;

II i IV p < 0,05; III i IV p > 0,05.

Tabela 10.

Zachowanie się aktywności ChE w surowicy oraz w homogenacie tkanki wątrobowej szozurów.
 N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej,
 p - poziom istotności.

Badana grupa	Surowica /mU/ml/			Tkanka wątrobowa /mU/mg/		
	N	\bar{x} ± SEM	p	N	\bar{x} ± SEM	p
I - Kontrola	14	486,0 ± 14,2		13	0,93 ± 0,05	
II - Antikol /600 mg/kg/	11	419,2 ± 11,7	< 0,05	10	0,41 ± 0,04	< 0,05
III - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg	15	335,0 ± 12,3	< 0,05	12	0,54 ± 0,09	< 0,05
IV - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg + Antikol /600 mg/kg/	13	329,6 ± 24,5	< 0,05	11	0,68 ± 0,04	< 0,05

Porównanie ChE w surowicy pomiędzy grupami: II i III p < 0,05;

II i IV p < 0,05; III i IV p > 0,05.

Porównanie ChE w tkance wątrobowej pomiędzy grupami: II i III p > 0,05;

II i IV p < 0,05; III i IV p > 0,05.

Tabela 11.

Zachowanie się stężenia bilirubiny całkowitej w mg% w surowicy szczurów.
 N - liczebność badanej grupy, \bar{x} - wartość średnia, SEM - średni błąd średniej,
 p - poziom istotności.

Badana grupa	N	$\bar{x} \pm$ SEM	p
I - Kontrola	12	0,35 \pm 0,03	
II - Antikol /600 mg/kg/	10	0,59 \pm 0,08	> 0,05
III - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg	13	1,38 \pm 0,11	< 0,01
IV - D-galaktozamina 2 inj. 375 mg/kg + Antikol /600 mg/kg/	12	1,85 \pm 0,08	< 0,005

Porównanie bilirubiny w surowicy pomiędzy grupami: II i III p < 0,01;

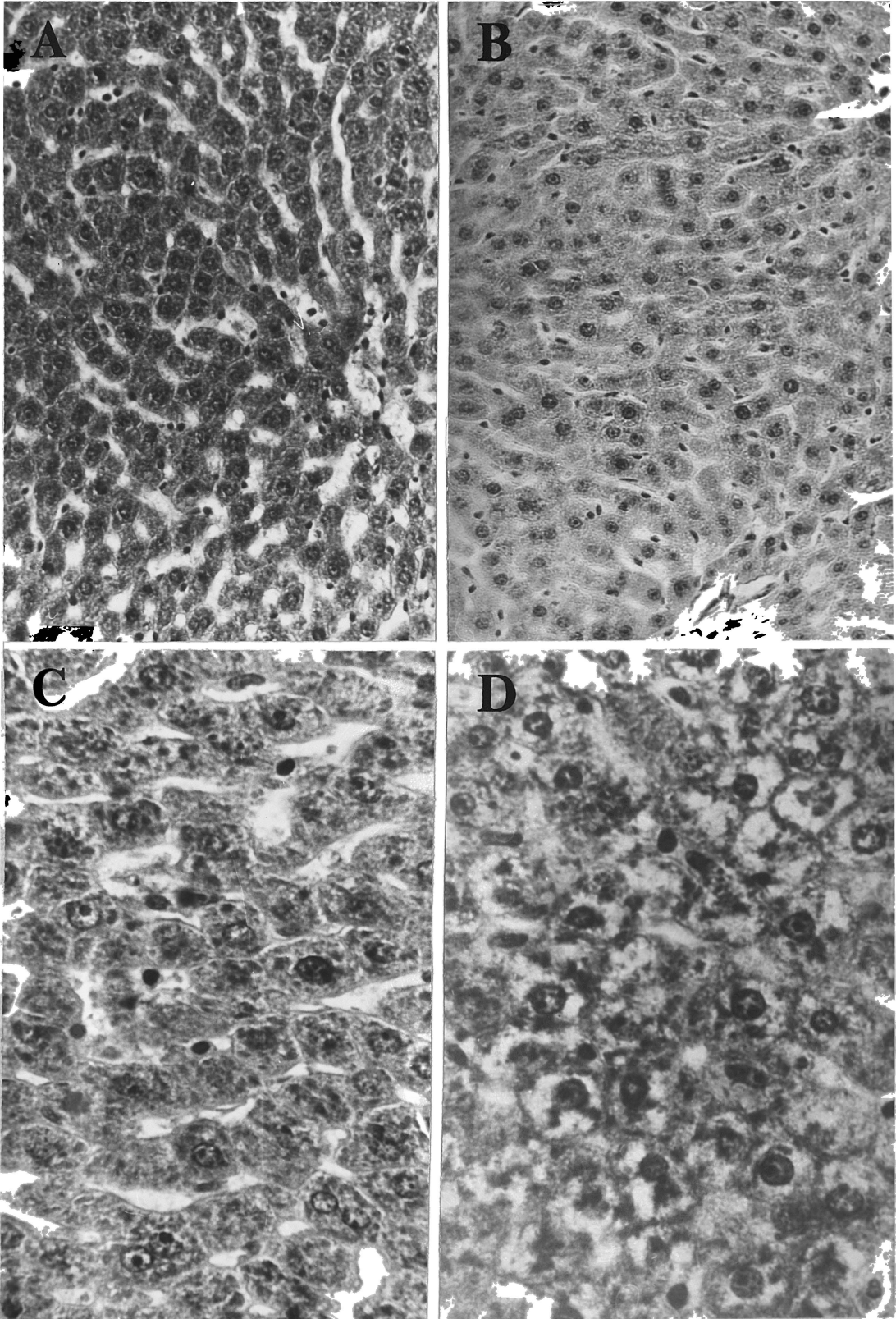
II i IV p < 0,01; III i IV p < 0,05.

A - wątroba szczura kontrolnego. Utrzymana typowa budowa beleczkowa komórek miąższowych. Powiększenie 260 x.

B - wątroba szczura otrzymującego disulfiram w dawce 150 mg/kg. Budowa zrazikowa utrzymana. Powiększenie 260 x.

C - wątroba szczura otrzymującego disulfiram w dawce 300 mg/kg. Silnie zaznaczona grudowatość cytoplazmy. Powiększenie 400 x.

D - wątroba szczura otrzymującego disulfiram w dawce 300 mg/kg. Poza zmianami jak na poprzednim zdjęciu /C/, widoczne zwyrodnienie wodniczkowe cytoplazmy komórek wątrobowych. Powiększenie 400 x.

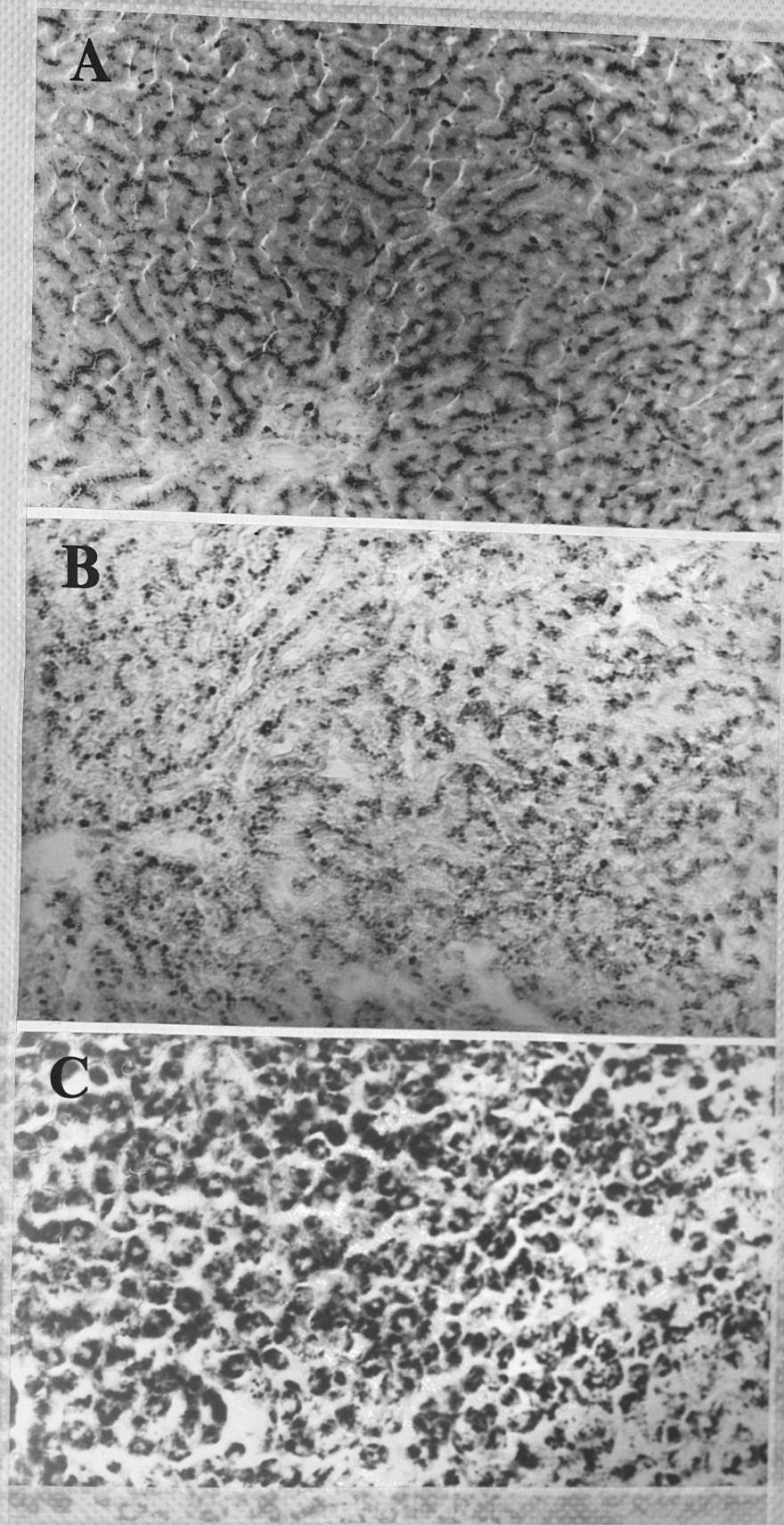


Ryc.1. Obrazy histologiczne wątroby szczurów, które otrzymywały przewlekle dożołądkowo disulfiram /Anticol/. Barwienie metodą H&E.

A - wątroba szczura kontrolnego. Reakcja w lizosomach regularnie rozmieszczonych wzdłuż kanalików żółciowych na biegunie wydalniczym komórek wątrobowych.

B - wątroba szczura otrzymującego disulfiram w dawce 150 mg/kg. Ogniskowe osłabienie i rozmycie odczynu z zaznaczoną miejscami utratą biegunowości hepatocytów.

C - wątroba szczura otrzymującego disulfiram w dawce 300 mg/kg. Widoczne skupienie odczynu w strefie okołojądrowej z zaburzeniem biegunowości hepatocytów, ponadto miejscami osłabienie odczynu oraz pojedyncze cytosegrosomy.

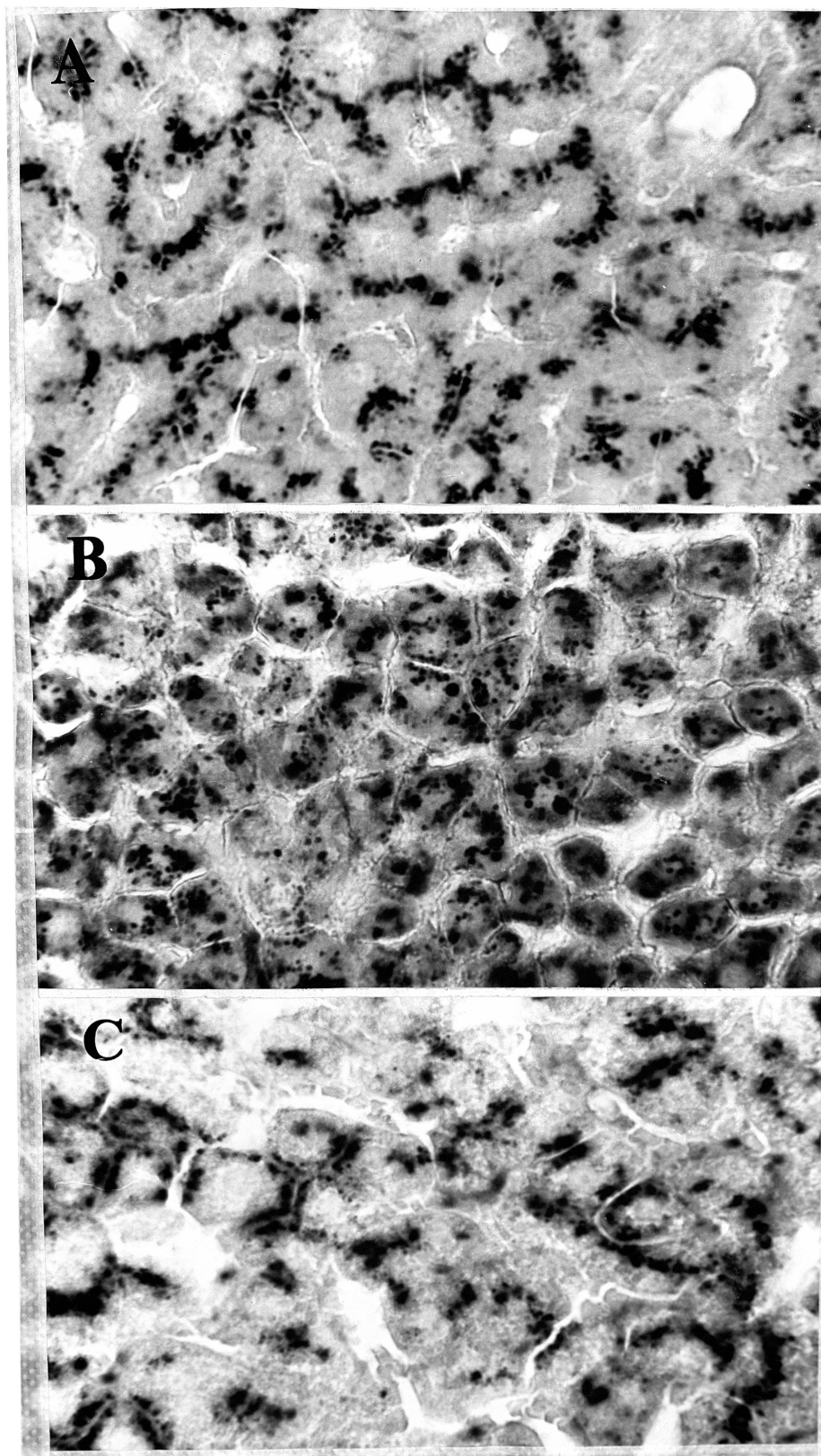


Ryc.2. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg Barki i Andersona w wątrobie szczurów, które otrzymywały przewlekle dożołądkowo disulfiram /Anticol/. Powiększenie 260 x.

A - wątroba szczura kontrolnego. Regularne rozmieszczenie znacznika lizosomów z utrzymaniem biegunowości hepatocytów.

B - odczyn w wątrobie szczura otrzymującego disulfiram /Anticol/ w dawce 300 mg/kg. Skupienie odczynu w strefie okołojądrowej z zaburzeniem biegunowości hepatocytów.

C - odczyn w wątrobie szczura z wszczepionym disulfiramem /Espéral/. W większości hepatocytów regularne rozmieszczenie lizosomów wzdłuż kanalików żółciowych na biegunie wydalniczym komórek wątrobowych.

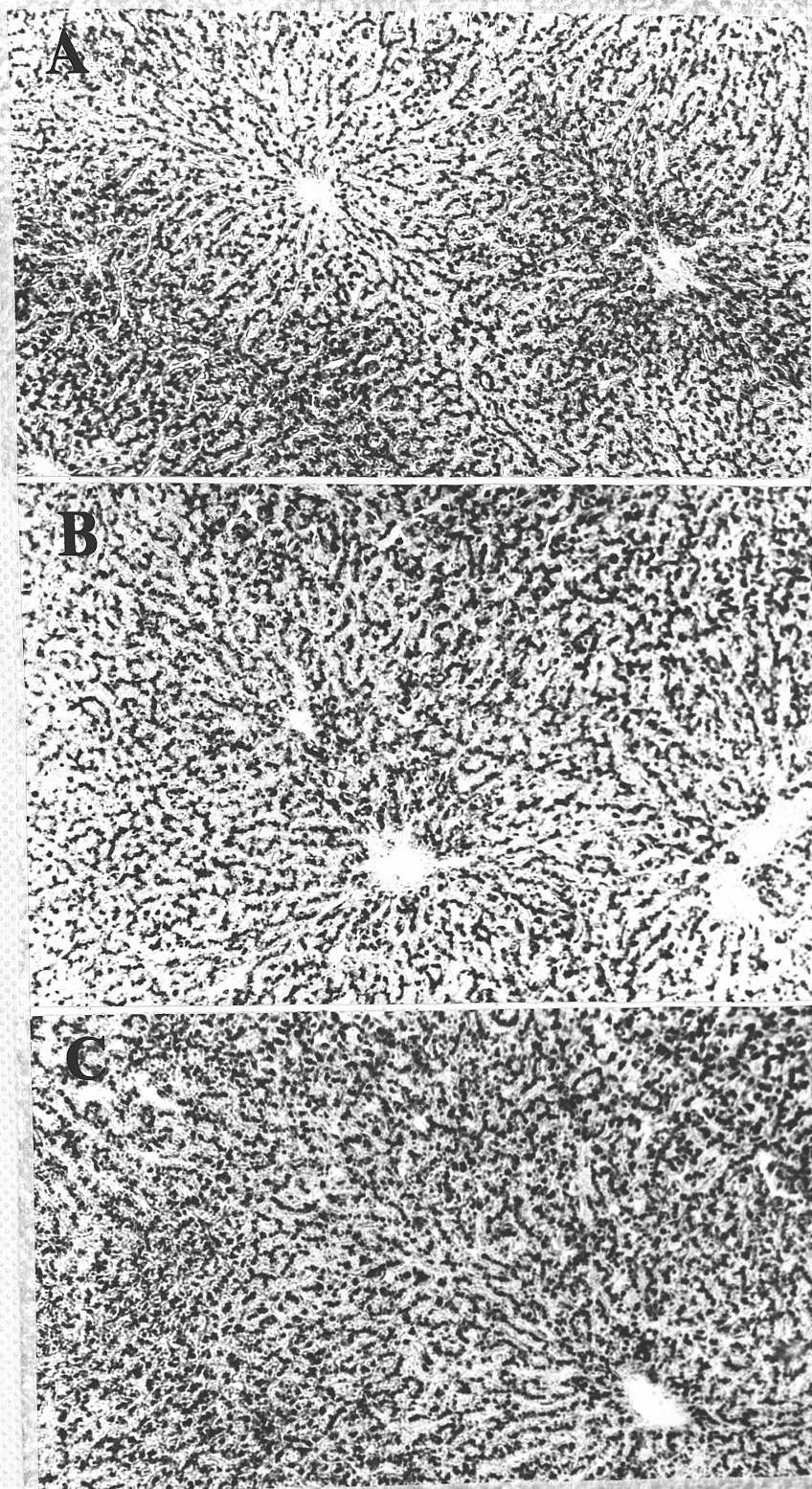


Ryc.3. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg Barki i Andersona w wątrobie szczurów, które otrzymywały przewlekle disulfiram. Powiększenie 400 x.

A - wątroba szczura otrzymującego przewlekłe disulfiram w dawce 150 mg/kg. Zaznaczona miejscami utrata biegunowości hepatocytów oraz osłabienie odczynu w III strefie gronka.

B - wątroba szczura otrzymującego przewlekłe alkohol w dawce 1,0 g/kg. Ogniskowe osłabienie odczynu z zatarciem biegunowości hepatocytów

C - wątroba szczura otrzymującego przewlekłe disulfiram /150 mg/kg/ łącznie z alkoholem /1,0 g/kg/. Zaznaczone niewielkie osłabienie odczynu w II i III strefie gronka z miejscami zaburzoną biegunowością hepatocytów

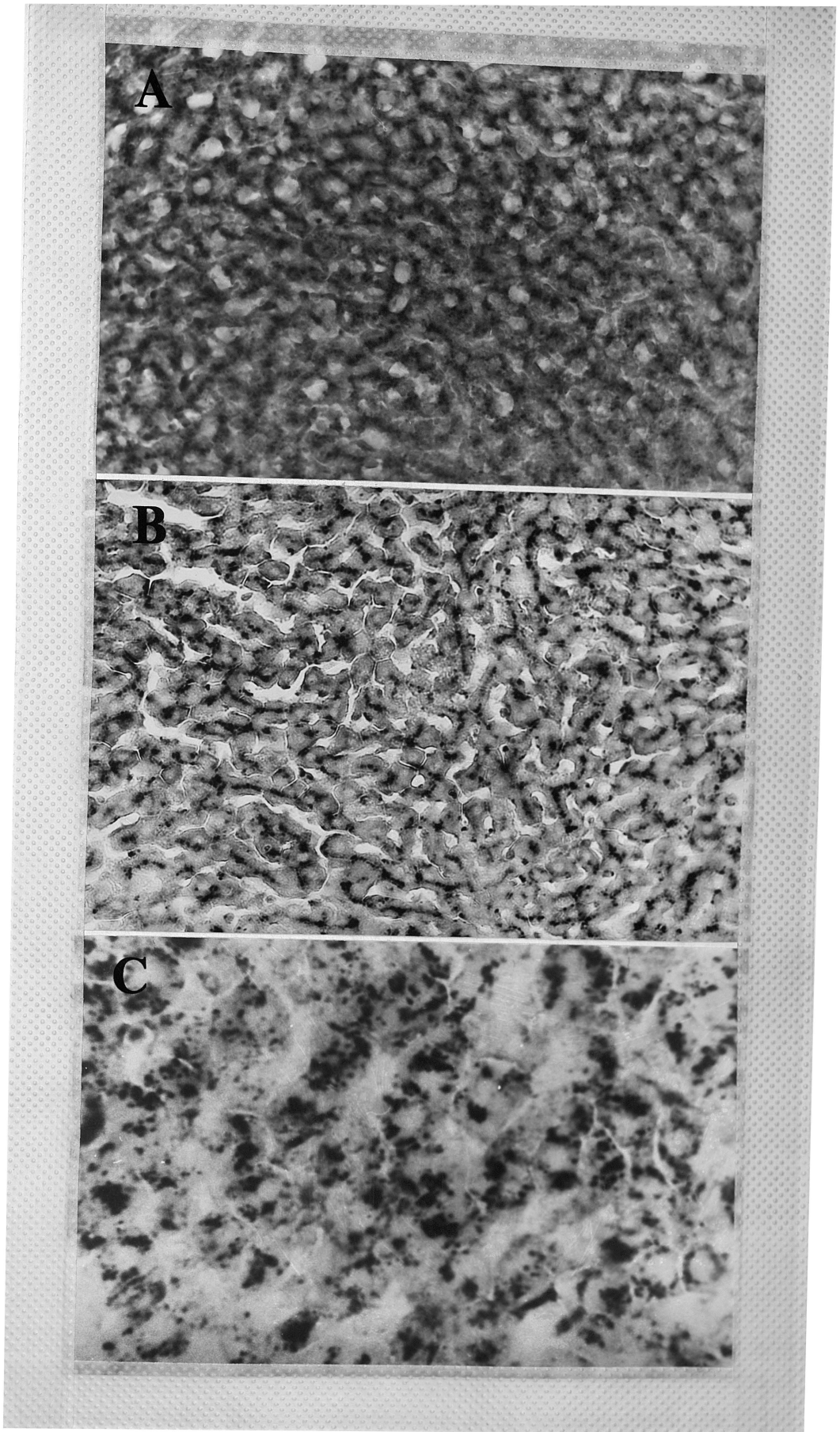


Ryc.4. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg Barki i Andersona w wątrobie szczurów, które otrzymywały przewlekle do-
żołądkowo disulfiram /Anticol/, alkohol oraz disulfiram
/Anticol/ łącznie z alkoholem. Powiększenie 100 x.

A - wątroba szczura kontrolnego. Regularne rozmieszczenie odczynu na biegunie wydaliniczym hepatocytów. Powiększenie 260 x.

B - wątroba szczura otrzymującego disulfiram /Anticol/ w dawce 150 mg/kg. Widoczne miejscami osłabienie i rozmycie odczynu. Powiększenie 260 x.

C - wątroba szczura z wszczepionym disulfiramem /Espeéral/. Zatarcie biegunowości hepatocytów i nieregularne rozproszenie lizosomów. Powiększenie 400 x.

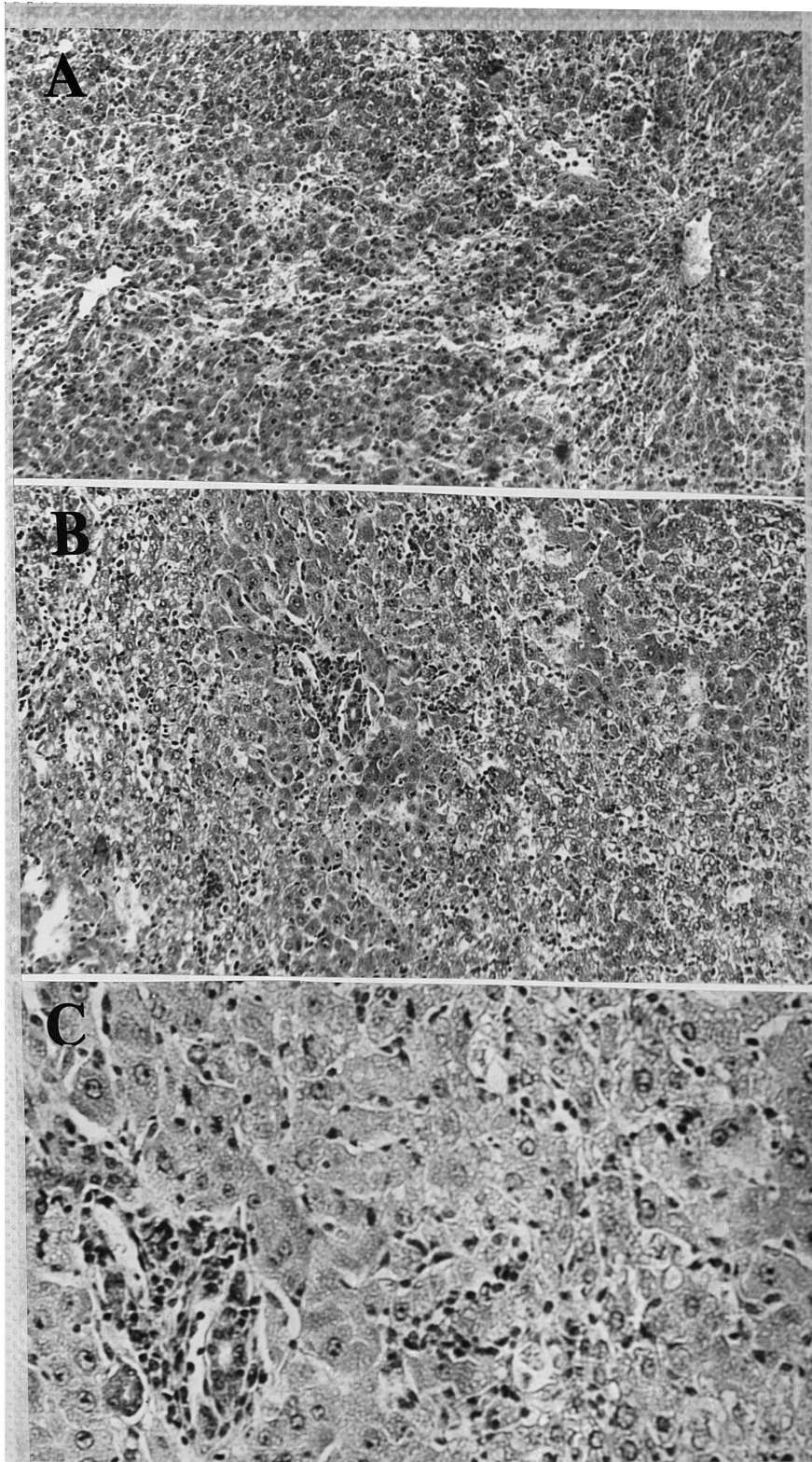


Ryc.5. Odczyn na β -glukuronidazę metodą Hayashi w wątrobie szczurów, które otrzymywały przewlekle disulfiram.

A - struktura zrazikowa wątroby utrzymana, rozległe nacieki zapalne złożone z komórek jednojądrzastych limfocytopodobnych oraz pola martwicy hepatocytów. Powiększenie 100 x.

B - zmiany histologiczne w wątrobie podobne do opisanych przy zdjęciu A, lecz bardziej nasilone. Powiększenie 100 x.

C - ten sam obraz jak B, lecz pod większym powiększeniem /260 x/.

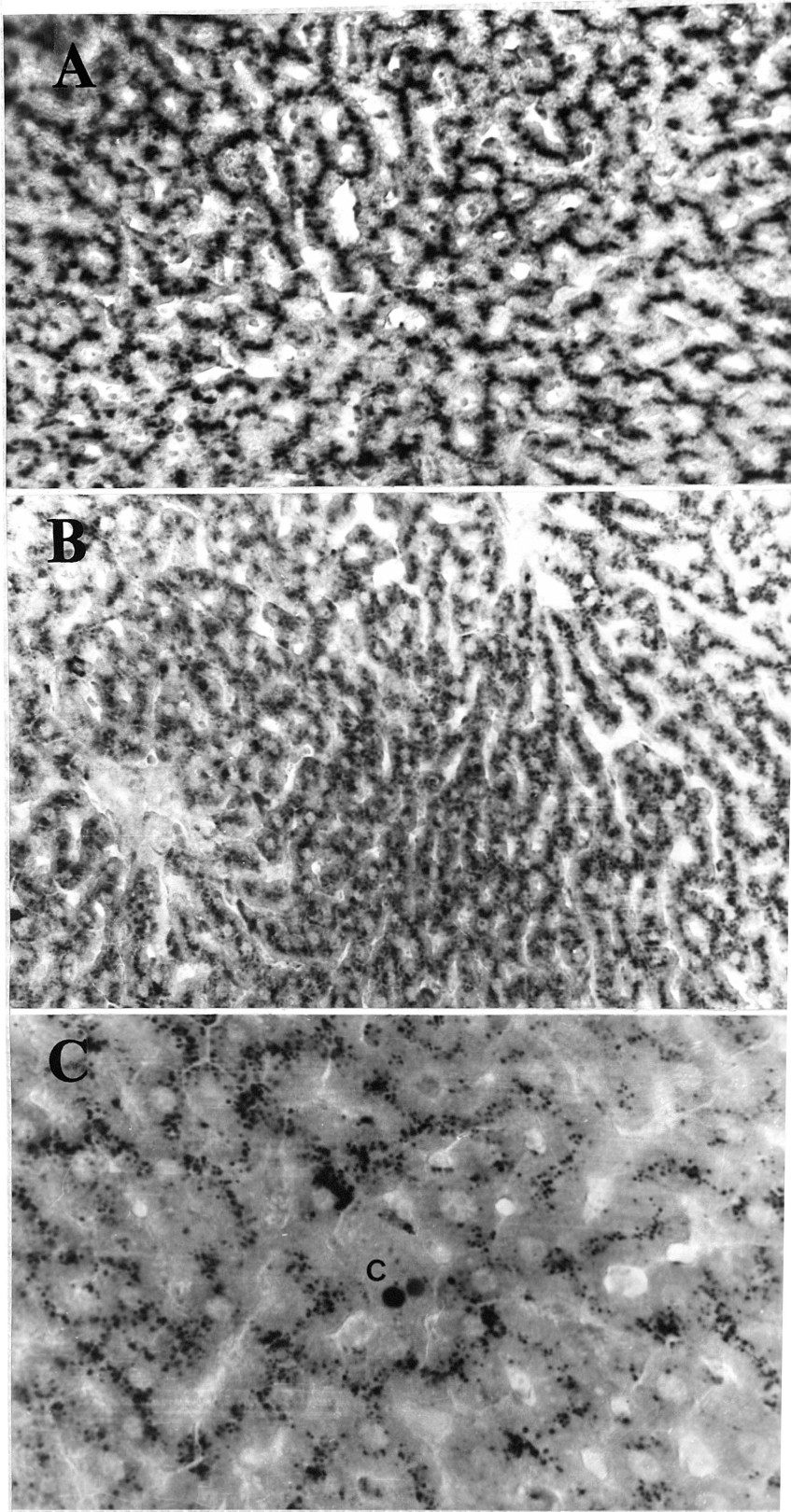


Ryc.7. Obrazy histologiczne wątroby szczurów, którym podano 2 iniekcje dootrzewnowe D-galaktozaminy w dawce 375 mg/kg, a następnie disulfiram /Anticol/ dożołądkowo w dawce 600 mg/kg przez 3 dni. Barwienie metodą H&E.

A - wątroba szczura kontrolnego. Widoczna reakcja w lizosomach regularnie rozmieszczonych wzdłuż kanałików żółciowych na biegunie wydalniczym komórek wątrobowych. Powiększenie 260 x.

B - wątroba szczura otrzymującego disulfiram. Ogniskowe osłabienie i rozmycie odczynu z zaznaczoną utratą biegunowości hepatocytów. W niektórych hepatocytach obecne cytosegrosomy. Powiększenie 260 x.

C - wątroba szczura otrzymującego disulfiram. Zmiany jak na powyższym /B/ zdjęciu pod większym powiększeniem /400 x/. Osłabienie i rozmycie odczynu, w innych hepatocytach grudowate skupienia lizosomów i duże lizosomy odpowiadające cytosegrosomom /C/.

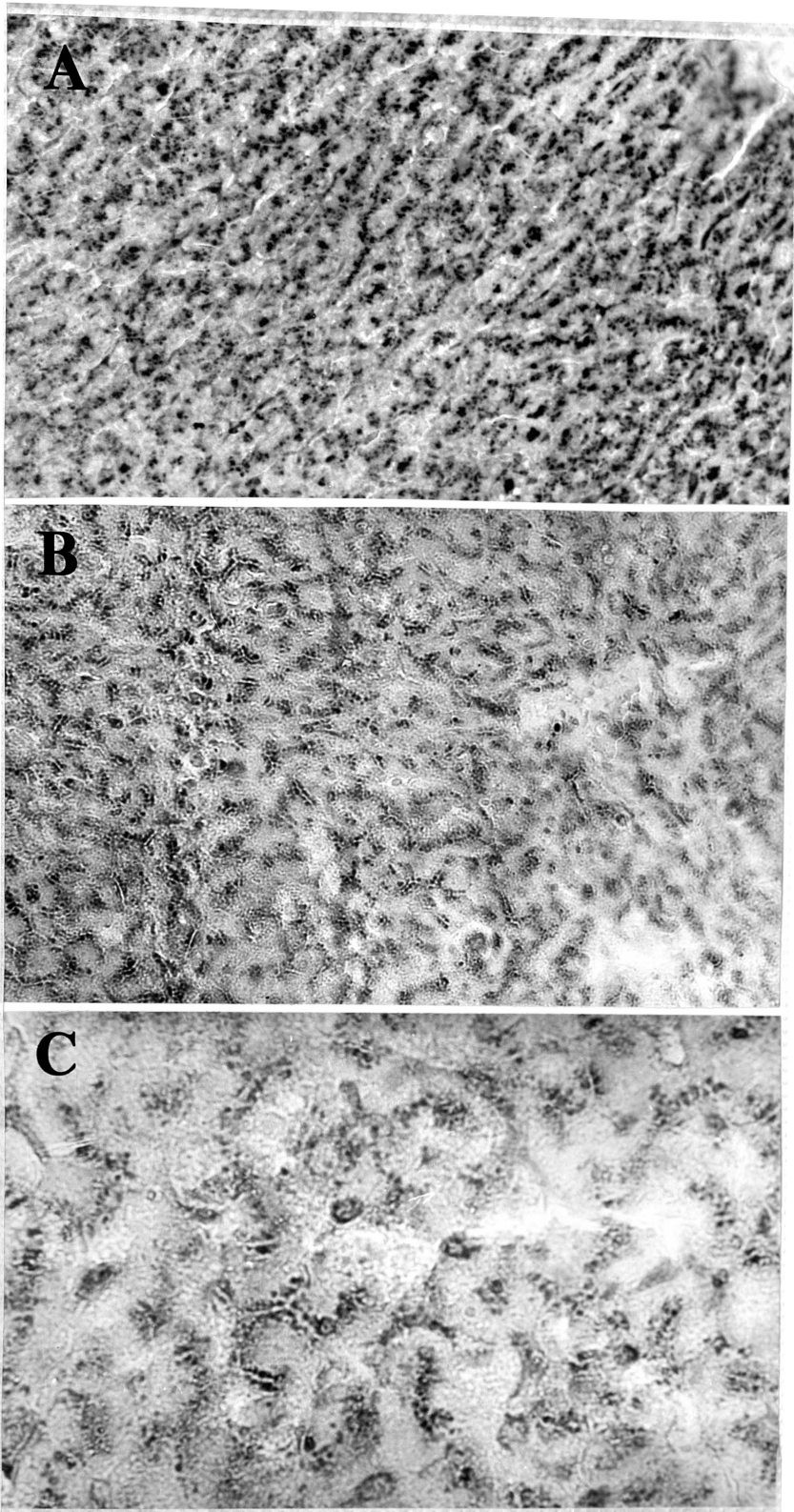


Ryc.8. Odczyn histochemiczny na β -glukuronidazę wg Hayashi w wątrobie szczurów, które otrzymały disulfiram /Anticol/ dożołądkowo w dawce 600 mg/kg przez 3 dni.

A - odczyn w wątrobie szczura, któremu podano disulfiram. Widoczne w części hepatocytów przemieszczenie odczynu do strefy okołojądrowej /zatarcie biegunowości hepatocytów/, miejscami osłabienie reakcji oraz obecne cytosegrosomy. Powiększenie 250 x.

B - odczyn w wątrobie szczura, któremu podano D-galaktozaminę. Widoczna miejscami utrzymana biegunowość hepatocytów, na obwodzie zatarcie biegunowości i osłabienie odczynu. Powiększenie 250 x.

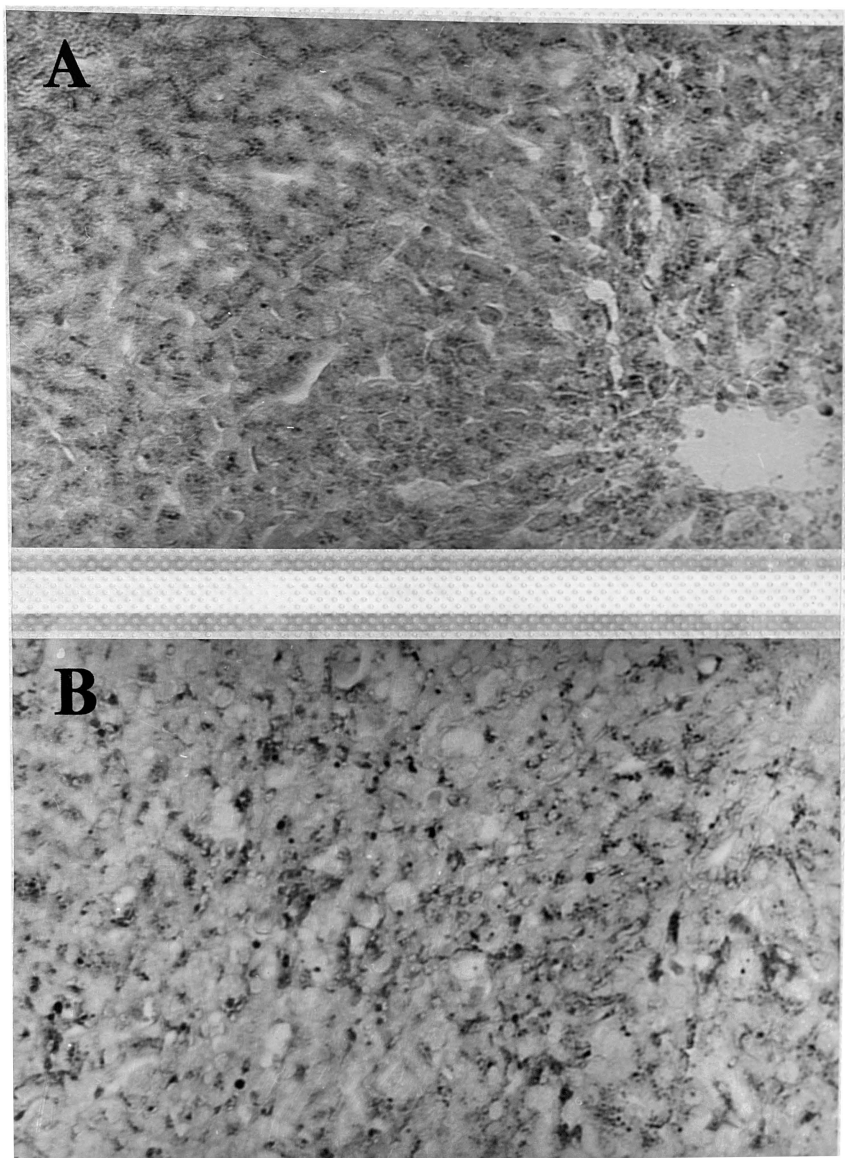
C - odczyn na fosfatazę kwaśną w wątrobie szczura, któremu podano D-galaktozaminę. Obraz jak wyżej /zdjęcie B/ lecz pod większym powiększeniem 400 x. Widoczna miejscami utrzymana biegunowość hepatocytów, miejscami zaś rozproszenie odczynu i jego osłabienie.



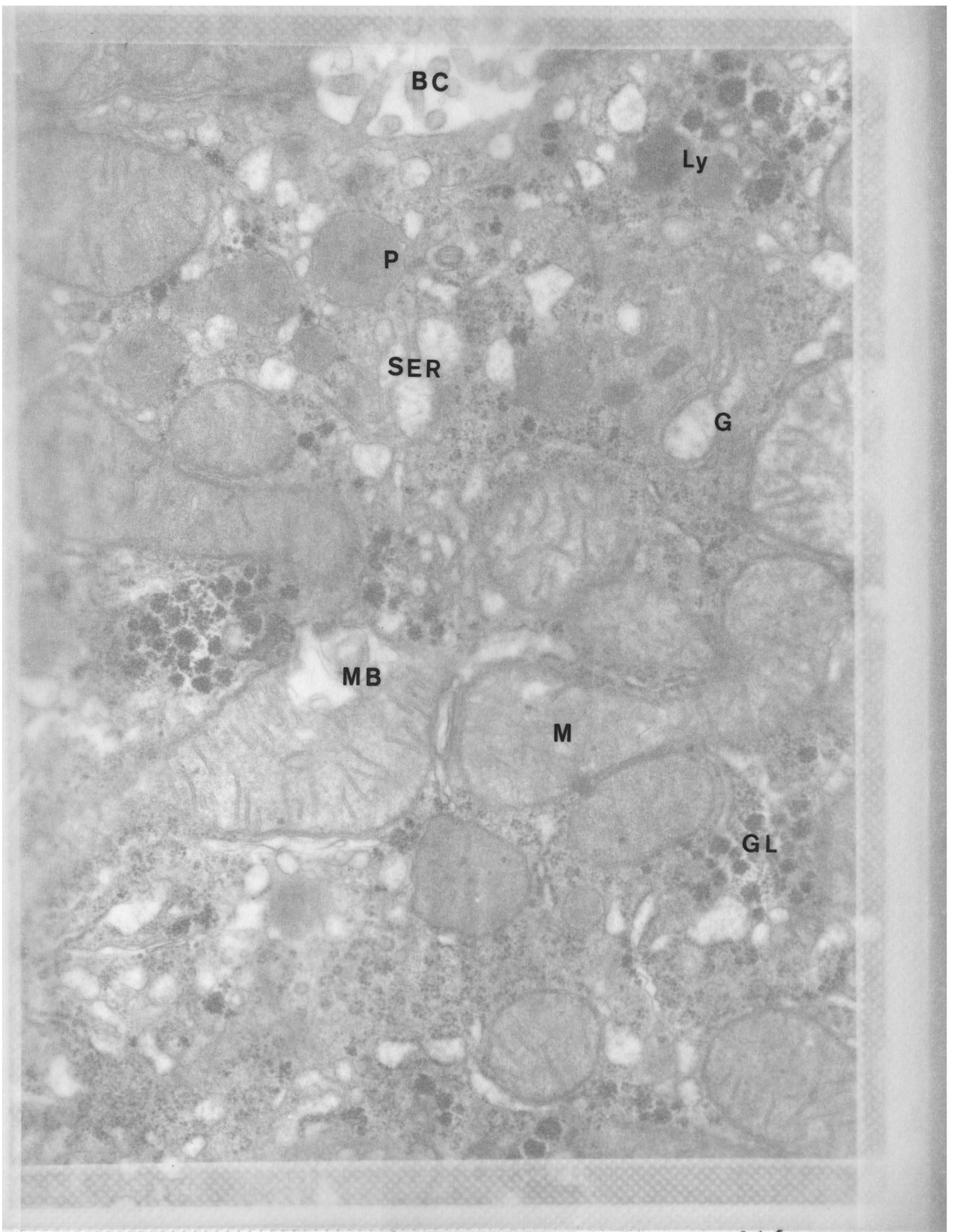
Ryc.9. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg Barki i Andersona w wątrobie szczurów, którym podano dożołądkowo disulfiram /Anticol/ w dawce 600 mg/kg przez 3 dni oraz 2 iniekcje dootrzewnowe D-galaktozaminy w dawce 375 mg/kg.

A - widoczna nieregularność odczynu, w niewielkiej części hepatocytów odczyn utrzymany, w przeważającej jednak ich części odczyn rozproszony i osłabiony.

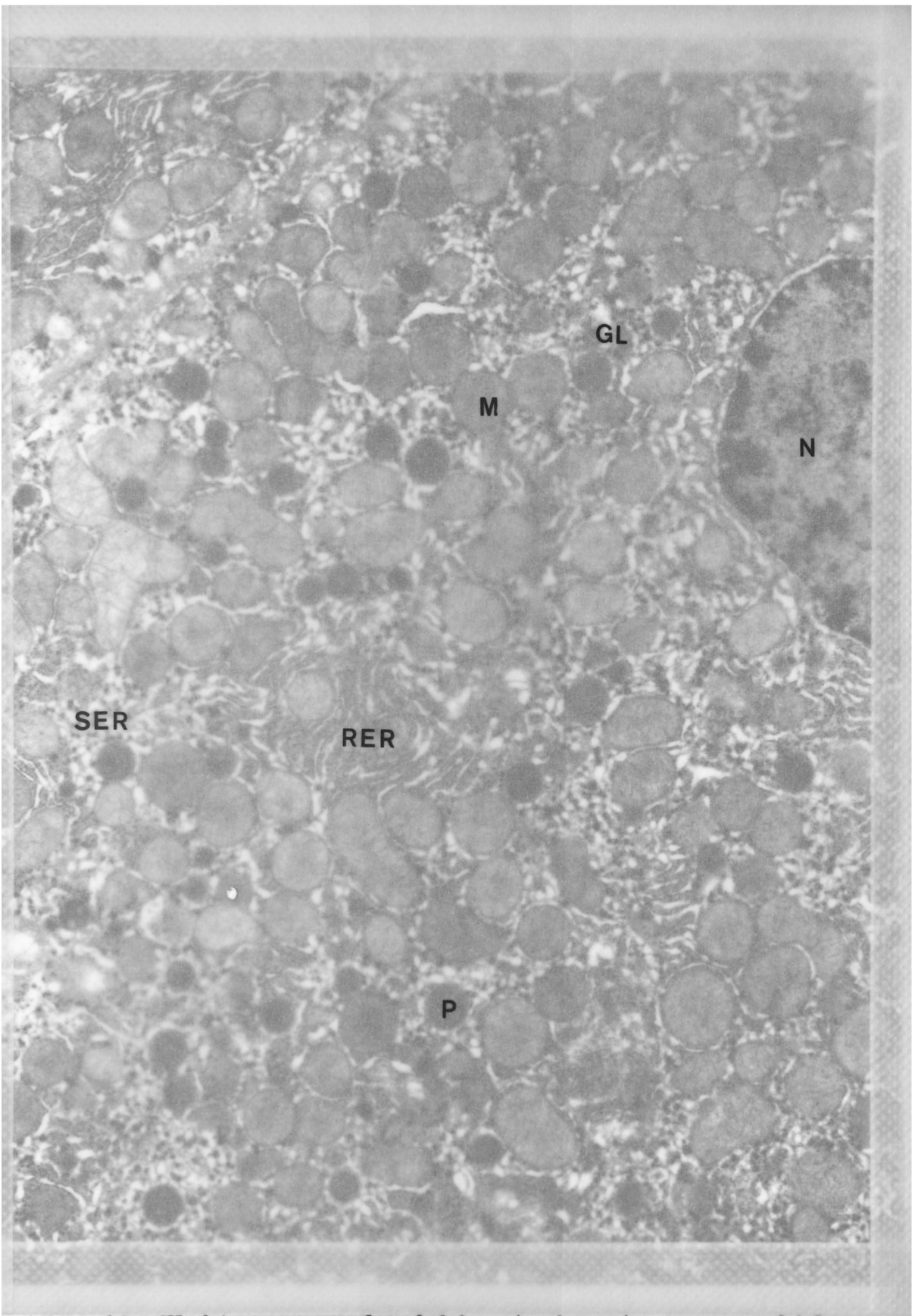
B - odczyn na fosfatazę kwaśną podobny jak wyżej, widoczne są ponadto duże lizosomy odpowiadające cytosegrosomom.



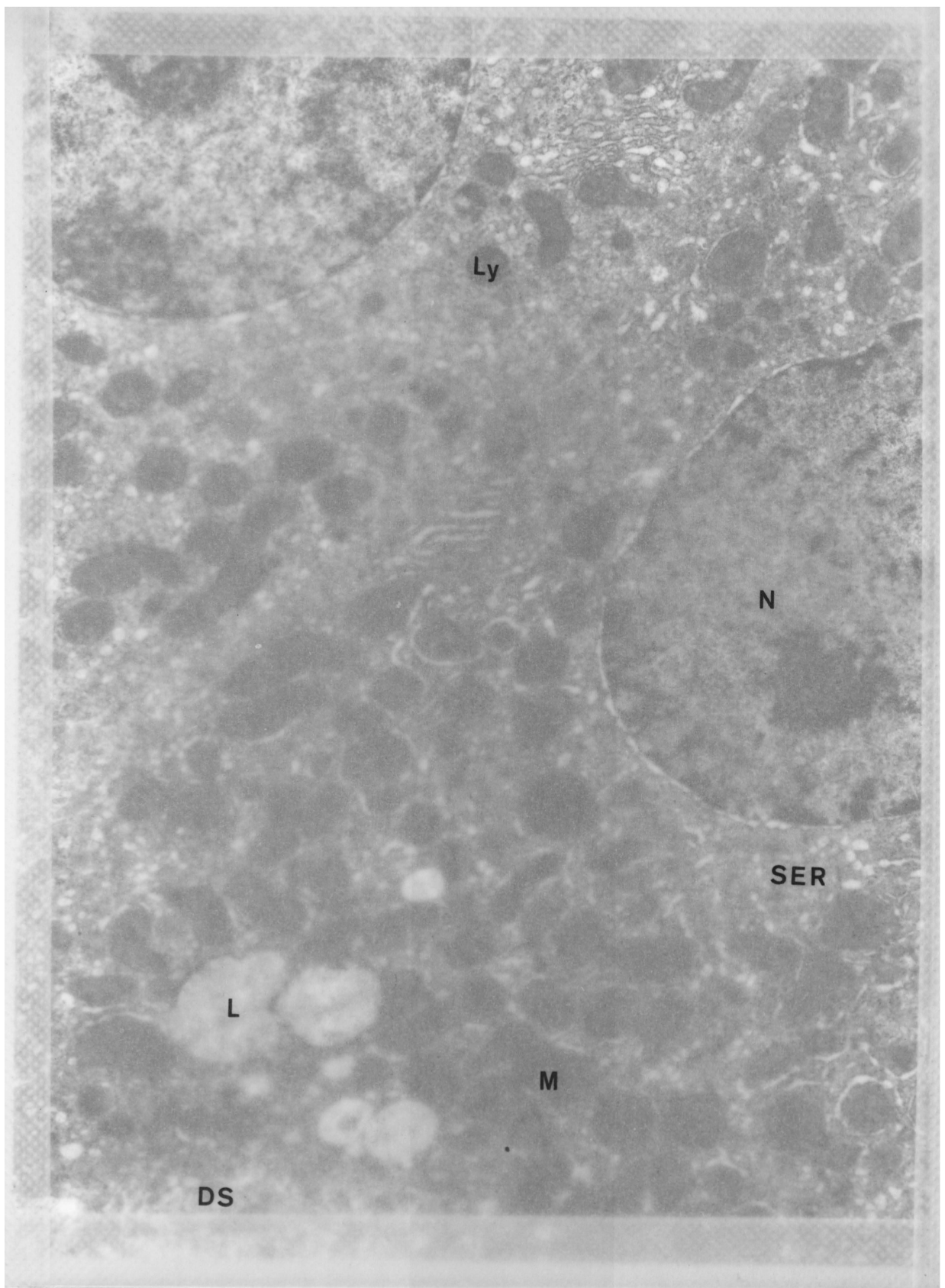
Ryc.10. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg Barki i Andersona w wątrobie szczurów, którym podano D-galaktozaminę /2 iniekcje dootrzewnowe w dawce 375 mg/kg/, a następnie disulfiram /Anticol/ /dożołądkowo w dawce 600 mg/kg przez 3 dni/. Powiększenie 260 x.



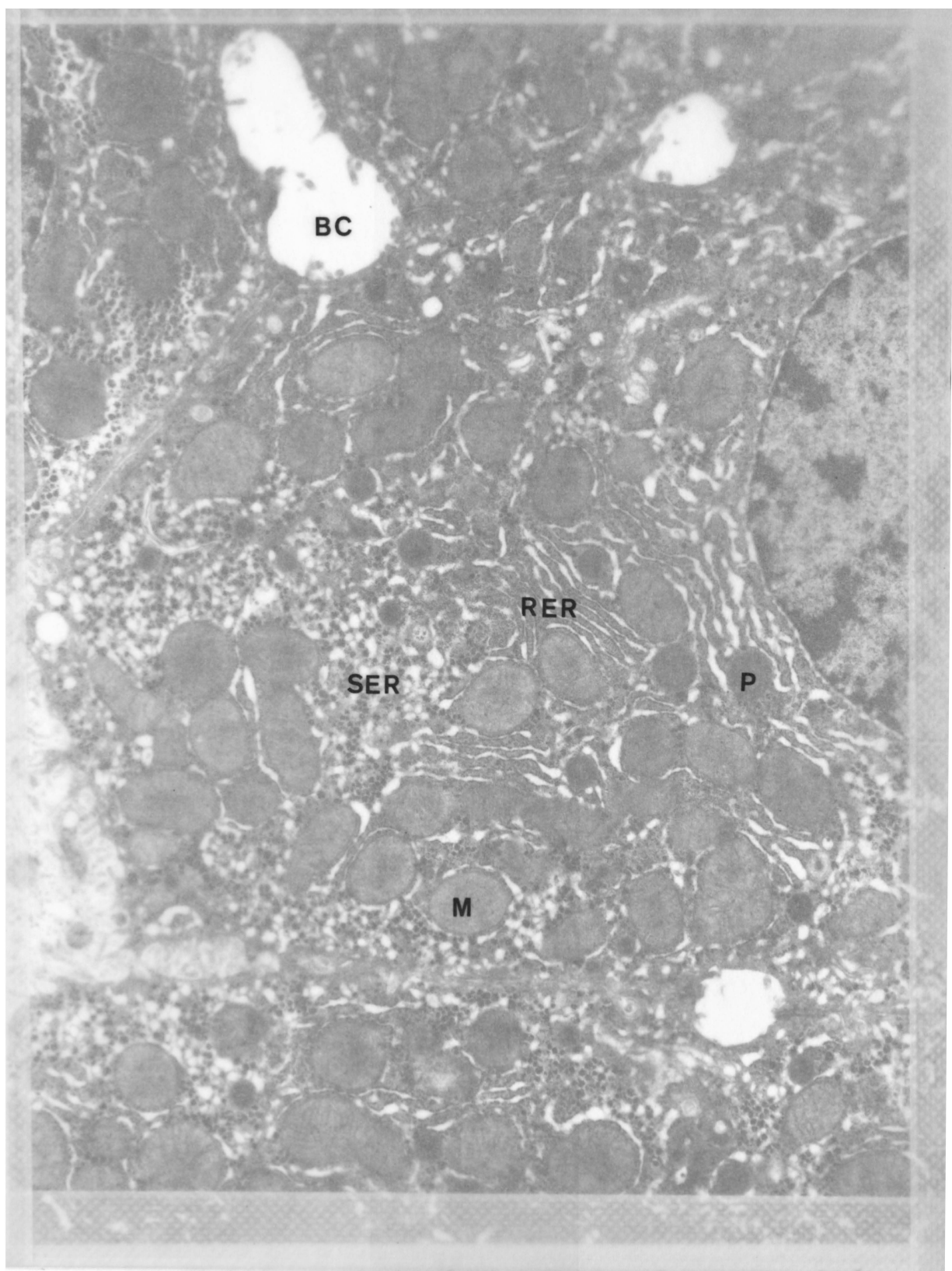
Ryc.11. Elektronogram komórki wątrobowej szczura, który otrzymywał przewlekle dożołądkowo disulfiram /Anticol/ w dawce 150 mg/kg. Mitochondria /M/ o zróżnicowanym kształcie, niejednorodnej gęstości elektronowej macierzy i miejscami zniekształconymi grzebieniami; MB - figura mielinowa; GL - glikogen; SER - siateczka śródplazmatyczna gładkościenna z poszerzonymi kanałami; BC - kanalik żółciowy z mikrokosmkami; G - strefa Golgiego; Ly - lizosom; P - peroksysom. Powiększenie 30000 x.



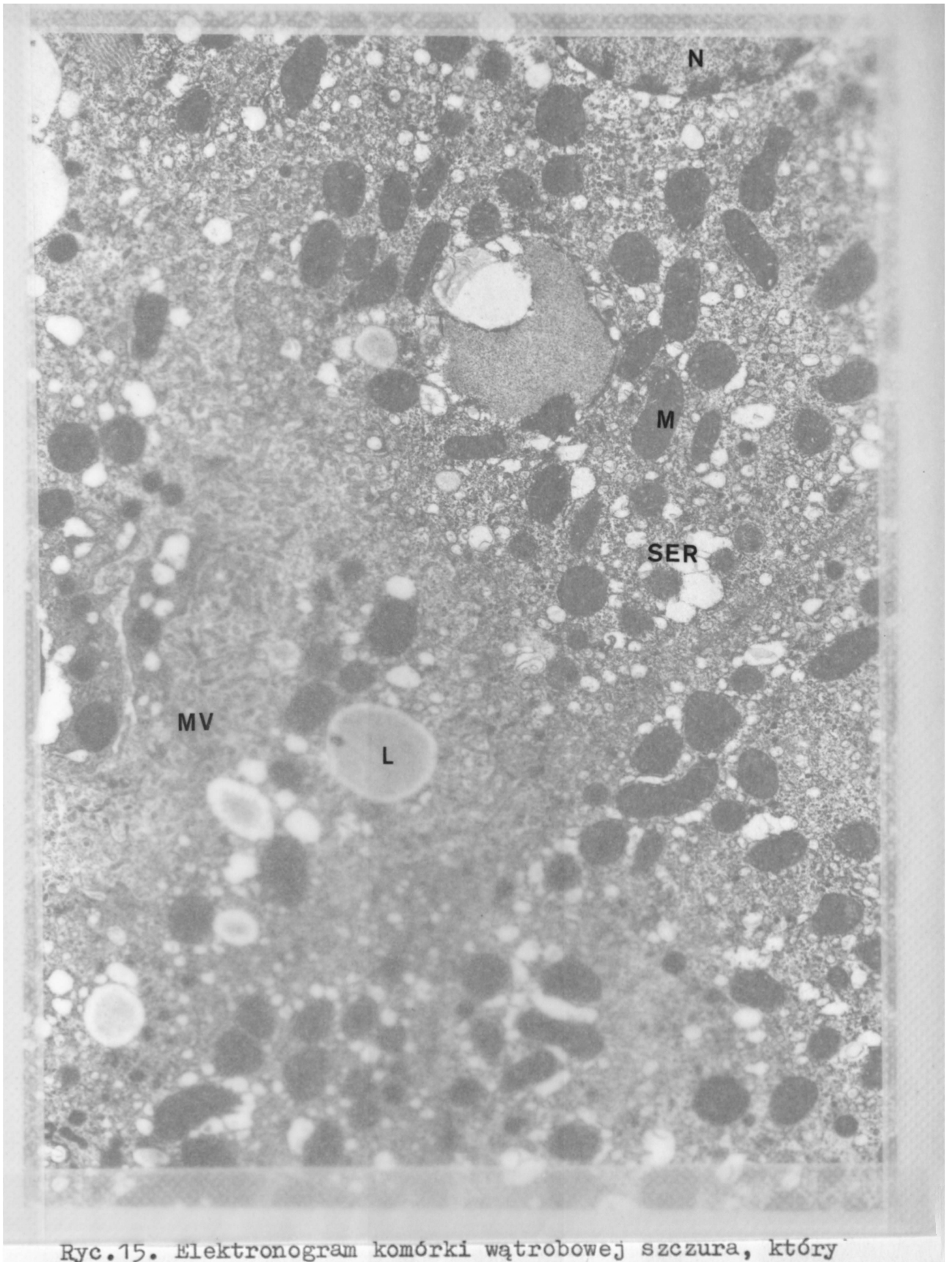
Ryc.12. Elektronogram komórki wątrobowej szczura, który otrzymał przewlekle dożołądkowo disulfiram /Anticol/ w dawce 150 mg/kg. M - mitochondria z macierzą o niejednorodnej gęstości elektronowej; N - jądro; GL - glikogen; SER - siateczka gładka śródplazmatyczna, pomnożona; RER - faliście przebiegająca szorstka siateczka śródplazmatyczna; P - peroksosom, zwraca uwagę zwiększona ich ilość. Powiększenie 12000 x.



Ryc.13. Elektronogram komórki wątrobowej szczura, który otrzymywał przewlekle dożołądkowo disulfiram /Anticol/ w dawce 150 mg/kg łącznie z alkoholem w dawce 1,0 g/kg. Nierównomierne rozmieszczenie organelli komórkowych. Brak glikogenu. Macierz mitochondrialna /M/ o zróżnicowanej gęstości elektronowej; N - jądro; L - krople lipidowe; Ly - lizosom; SER - siateczka śródplazmatyczna gładka; DS - przestrzeń Dissego. Powiększenie 12000 x.



Ryc.14. Elektronogram komórki wątrobowej szczura, który otrzymywał przewlekle dożołądkowo alkohol w dawce 1,0 g/kg. Zwraca uwagę pomnożona ilość siateczki śródplazmatycznej gładkiej /SER/, zróżnicowana gęstość elektronowa macierzy mitochondrialnej /M/ oraz poszerzone kanaliki żółciowe /BC/, których niektóre odcinki są pozbawione mikrokosmków; RER - siateczka śródplazmatyczna szorstka; P - peroksyosom. Powiększenie 12000 x.



Ryc.15. Elektronogram komórki wątrobowej szczura, który otrzymywał przewlekle dożołądkowo alkohol w dawce 1,0 g/kg. Zwraca uwagę pomnożona siateczka śródplazmatyczna gładka /SER/ z poszerzonymi kanałami, obecność kropli lipidowych /L/; M - mitochondria o zróżnicowanym kształcie; N - jądro; MV - mikrokosmki. Powiększenie 12000 x.